

Nancy 1975

Pierre MAFART

ETUDE D'UNE

METHODE RADIOMETRIQUE RAPIDE

DE DETECTION DES CONTAMINATIONS

MICROBIENNES DANS LA BIÈRE

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555024_0014

U N I V E R S I T E D E N A N C Y I

Thèse présentée par Pierre MAFART pour obtenir
le grade de Docteur - Ingénieur

ETUDE D'UNE METHODE RADIOMETRIQUE RAPIDE DE DETECTION DES
CONTAMINATIONS MICROBIENNES DANS LA BIERE

Soutenance le 4 Juillet 1975

Jury : M. L. CHAPON, Professeur, Président
M. G. SIEST, Professeur
M. C. BOURGEOIS, Maître de Conférence
M. M. MOLL, Directeur du Laboratoire TEPRAL

AO - 11-566



AVANT-PROPOS

Les recherches faisant l'objet de cette thèse ont été effectuées dans le laboratoire de microbiologie de l'E.N.S.A.I.A. de Nancy, puis dans le cadre de l'I. U. T. de Quimper (département Biologie Appliquée) et du laboratoire du Collège de France à Concarneau.

Je suis tout d'abord profondément reconnaissant à M. Claude BOURGEOIS alors Maître-Assistant à l'E.N.S.A.I.A. d'avoir bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et d'avoir assumé la direction scientifique de ma thèse. Au cours de nombreuses discussions stimulantes, M. BOURGEOIS m'a consacré beaucoup de temps pour orienter la réalisation de ce travail. Il m'a été particulièrement précieux de débiter dans la recherche sous une direction scientifique me permettant de travailler dans un climat à la fois de liberté par son caractère plus persuasif qu'autoritaire, et de sécurité par la confiance qu'elle inspirait. Après avoir suivi M. BOURGEOIS nommé Maître de Conférences à l'I.U.T. de Quimper, je souhaite que les circonstances me permettent de travailler encore longtemps avec lui.

Je suis heureux de remercier M. le Professeur L. CHAPON, professeur de chimie biologique à l'Université de Nancy I, d'avoir bien voulu parrainer ce travail et présider le jury de son examen. Je remercie également MM. SIEST et MOLL de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

De nombreuses personnalités universitaires et industrielles m'ont aidé à la réalisation de cette thèse. Je suis reconnaissant à M. BARTHEL, professeur de statistiques à l'E.N.S.A.I.A., qui s'est toujours montré disponible à mon égard lorsque j'avais besoin d'un conseil relatif à un problème statistique.

Je remercie également Mlle PIGNAL (Laboratoire de mycologie de l'Université de Lyon) de m'avoir accueilli quelques jours dans son laboratoire pour m'initier à la systématique et à l'identification des levures et de m'avoir fourni les souches dont j'avais besoin.

Je dois beaucoup à M. Y. Le GAL, sous-directeur au Collège de France, Directeur du Laboratoire de Biologie Marine de Concarneau qui m'a permis de poursuivre mes recherches dans son laboratoire. Je remercie toute l'équipe de ce laboratoire pour son excellent accueil.

Le climat de solidarité qui règne en général à l'I. U. T. de Quimper m'a permis de concilier mes activités de chercheur et d'enseignant. Je remercie tout particulièrement M. LE CAM, Directeur de l'I. U. T. et M. J.J. CLERET, Chef du département de Biologie Appliquée pour leur accueil et leur respect des intérêts de chaque enseignant leur permettant de poursuivre une activité de chercheur malgré les difficultés que cela représente dans un I. U. T.

Ces recherches commencées par D. THOUVENOT, grâce à l'aide financière de KRONENBOURG ont été poursuivies grâce à l'aide financière qui nous a été apportée par TEPRAL. Nous en remercions vivement ces deux sociétés. Nous sommes particulièrement reconnaissant à M. MOLL, Directeur et son collaborateur, M. DUTEURTRE B. pour leur participation active à la définition et au contrôle de ces recherches.

Je remercie aussi le personnel de la Brasserie S.E.B. de Champigneulles qui s'est toujours montré coopératif lors des prélèvements que j'ai effectués en usine. Par la suite, j'ai toujours été reçu très aimablement à la brasserie S.E.B. de Brest par son Directeur Technique M. BECHEREL et ses collaborateurs que je suis heureux de remercier ici. Mon passage au Centre Technique de Brasserie et Malterie a été bénéfique pour l'enrichissement de mon expérience industrielle. Je remercie son Directeur M. DEYMIE pour l'intérêt qu'il a manifesté pour ces recherches et pour ces encouragements.

Je remercie enfin Mme PALUD d'avoir dactylographié cette thèse.

S O M M A I R E

	<u>Pages</u>
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>CHAPITRE I - DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	2
1.1. - <u>Méthodes radiométriques de détection des contaminations</u>	2
1.1.1. - Méthodes utilisant la production de $^{14}\text{CO}_2$ par les contaminants	2
1.1.2. - Méthodes utilisant l'accumulation dans la cellule d'un métabolite marqué	6
1.2. - <u>Transport des aminoacides</u>	7
 <u>CHAPITRE II - TECHNIQUE ET CARACTERISTIQUES DE LA METHODE</u>	13
2.1. - <u>Mise au point technique</u>	13
2.1.1. - Techniques microbiologiques générales	13
2.1.2. - Choix du milieu de culture de détection	14
2.1.3. - Méthode d'analyse	16
2.1.4. - Problème du bruit de fond	18
2.2. - <u>Caractéristiques de la méthode</u>	24
2.2.1. - Décision	25
2.2.2. - Sélectivité et quantitativité	27
 <u>CHAPITRE III - OPTIMISATION ET GENERALISATION DE LA METHODE</u>	30
3.1. - <u>Optimisation de la méthode appliquée à la détection des levu- res de culture</u>	30
3.1.1. - Essais réalisés sur cultures en phase exponentielle	30
3.1.2. - Essais réalisés avec des cellules prélevés en milieu industriel	32
3.1.3. - Essais d'applications pratiques de la méthode en usine	40

3.2. - <u>Généralisation de la méthode</u>	44
3.2.1. - Cas des levures sauvages	44
3.2.2. - Cas des bactéries	47
 <u>CONCLUSION</u>	51
 <u>ANNEXE</u>	53
 <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	57

ooo 0 ooo

INTRODUCTION

La recherche des contaminations dans la bière met en jeu classiquement la filtration sur membrane, la détection des microorganismes pouvant ensuite se faire de deux manières. Le procédé le plus courant consiste à déposer la membrane sur un milieu gélosé ou sur un disque de carton imbibé de milieu nutritif, de façon à permettre le développement de colonies ; dans ce cas, toute cellule présente sur la membrane sera détectée à l'issue d'un temps d'incubation pouvant varier de 2 à 7 jours. L'autre méthode consiste, après une brève incubation éventuelle, à colorer les cellules présentes, à sécher et transpariser la membrane et à y rechercher directement au microscope les cellules microbiennes ; selon Richards, le seuil de détection, pour certaines levures au moins, est alors de 500 cellules par membrane, après une incubation de 5 heures.

La sensibilité et la rapidité de la détection sont donc contradictoires et les possibilités actuelles ne satisfont pas l'utilisateur.

La difficulté résidant dans la petite taille des cellules microbiennes, l'idée s'impose de les marquer sur la membrane, afin qu'elles soient détectables lors d'un examen global. Deux méthodes sont utilisables à cet effet :

- le marquage optique ; une technique intéressante consiste à détecter la fluorescence émise par la luciférine au contact des microorganismes ; elle a été publiée par la NASA, mais semble n'avoir été appliquée qu'à la détection de contaminations importantes de produits biologiques ;

- le marquage radioactif sur lequel nous nous étendrons plus longuement dans le chapitre I : l'incubation d'une population microbienne en présence d'un sucre marqué au ^{14}C , suivi de la mesure de la radioactivité du CO_2 dégagé à l'aide d'un Flow Counter, a été proposée comme méthode d'évaluation quantitative des contaminations microbiennes.

La méthode ayant fait l'objet de notre travail, sensiblement différente, est fondée sur la propriété des cellules microbiennes de concentrer certains métabolites. Le marquage des contaminants est alors le résultat de l'accumulation massive d'un métabolite radioactif permettant de détecter rapidement la contamination et d'évaluer son importance quantitative.

CHAPITRE I

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Bien que les techniques radiométriques utilisées jusqu'à présent pour la détection des contaminations soient fort éloignées de celle avant fait l'objet de notre travail, elles présentent pourtant deux caractères communs : leur rapidité et leur quantitativité particulière qui correspond davantage à une activité biologique qu'à un nombre de cellules. A ce titre, il nous a paru intéressant de dresser une revue bibliographique de ces méthodes radiométriques.

D'autre part, notre technique nous a amené à étudier les données bibliographiques relatives au transport des acides aminés, en particulier de la lysine, chez les microorganismes.

1-1 - Méthodes radiométriques de détection des contaminations

1.1.1. - Méthodes utilisant la production de $^{14}\text{CO}_2$ par les contaminants

Les premières méthodes radiométriques utilisées pour la détection de contaminations remontent à une vingtaine d'années. Elles sont basées sur le principe suivant : les germes sont cultivés sur milieu liquide contenant un métabolite marqué au carbone 14. Le métabolisme du composé marqué produit du $^{14}\text{CO}_2$ qui est piégé par une solution d'hydroxyde de barium ou de potassium. L'activité du ^{14}C -carbonate ainsi obtenu est ensuite mesurée à l'aide d'un compteur de radioactivité. Toutes ces méthodes, basées sur le même principe ne diffèrent que par leurs mises en oeuvre techniques et les conditions de culture : (composition du milieu, température d'incubation). Elles suscitent encore actuellement un grand intérêt grâce à leur remarquable efficacité dans certains domaines d'application et grâce à leur automatisation aisée. Un appareil automatique fonctionnant sur ce principe a été breveté par la société WH JOHNSTON (1968) et est commercialisé sous le nom de BACTEC.

Il semble que les premières applications d'une méthode radiométrique de détection au $^{14}\text{CO}_2$ soient dues à LEVIN (1956) pour la recherche des coliformes dans l'eau. L'auteur justifie le choix du carbone 14 comme radio-isotope utilisé dans sa méthode en éliminant le phosphore 32 et le soufre 35 de périodes trop courtes pour une utilisation de routine, et le tritium dont la désintégration s'accompagne d'un dégagement d'énergie trop faible rendant le comptage difficile par rapport à celui de l'activité du carbone 14.

LEVIN utilise donc le ^{14}C - lactose pour la détection des coliformes dans l'eau et réussit à détecter 125 cellules en 1 heure. Un peu plus tard (1957), l'auteur remplace le ^{14}C - lactose par du ^{14}C - formate jugé moins coûteux. LEVIN signale deux sources d'erreur dans sa méthode : d'abord les quantités de CO_2 produites par les germes sont très variables d'une souche à l'autre, même à l'intérieur du groupe des coliformes. D'autre part, au sein d'une même souche, la quantité de CO_2 produite varie en fonction de l'état physiologique des cellules.

En 1974, la méthode de LEVIN est reprise par BACHRACH et BACHRACH pour la détection de *E. coli* dans l'eau. Ces auteurs, utilisant également le ^{14}C - lactose, mettent en évidence l'intérêt d'ajouter au milieu de culture du lactose non marqué afin de faciliter l'induction de la β - galactosidase. Ils annoncent la détection de 10^3 cellules de coliforme en 2 heures, de 10^2 en 3 heures, de 1 à 10 cellules en 6 heures.

L'application de la méthode de détection radiométrique au $^{14}\text{CO}_2$ s'est étendue au domaine médical. LEVIN lui-même avait proposé l'application de sa méthode à l'évaluation de la croissance en présence de divers antibiotiques de façon à les tester, application qui fut mise au point par HEIM en 1960. La méthode fut reprise par KILBOURN et BRAMHALL (1973) pour doser les antibiotiques dans l'urine et pour tester leur efficacité.

DE LAND et WAGNER (1969 et 1970) proposent l'application de la méthode radiométrique pour détecter les croissances microbiennes dans le sang. Ils utilisent comme substrat marqué le ^{14}C - glucose dans un milieu de culture par ailleurs exempt d'hydrates de carbone. Les auteurs annoncent la détection de contaminations dans le sang en 1 h 30 à 3 h 30.

Ces performances sont contestées par WASHINGTON et HU (1971).

Les derniers auteurs cités annoncent la détection de quelques cellules de *S. aureus* et de *E. coli* en 18 h. Comparant la méthode radiométrique aux méthodes conventionnelles sur des prises d'essai de sang de patients, ils estiment que ces dernières méthodes sont aussi rapides que la première. PREVITE (1972) attribue ces divergences de résultats entre les deux équipes au fait que les conditions d'anaérobiose de WASHINGTON et HU n'étaient vraisemblablement pas suffisantes. Plus récemment, RANDALL (1972 et 1973) et ROSNER (1974) poursuivent l'étude de l'application de la méthode radiométrique dans la détection de la flore du sang. Le dernier auteur cité confirme la supériorité de cette méthode sur les autres techniques en ce qui concerne la rapidité de détection mais recommande pourtant l'application parallèle des méthodes classiques car certaines souches ne sont pas détectables par la méthode radiométrique : c'est le cas de certaines espèces de *Candida*, de bactéroïdes et d'enterocoques.

LEVIN G.V. (1963) et plus récemment PREVITE (1972) proposent l'utilisation de la méthode radiométrique au $^{14}\text{CO}_2$ dans le domaine des industries alimentaires. Le dernier auteur cité transpose la méthode de DE LAND et WAGNER à la détection des germes susceptibles de se développer dans les aliments en conserve. Alors que la détection de ces germes, selon SHARF (1966) demande 1 à 7 jours par les méthodes classiques, PREVITE annonce la détection de quelques cellules de *S. aureus* ou de *S. Typhimurium* en 10 heures et de 10^4 cellules de ces micro-organismes en 4 heures ; 2 000 spores de *C. botulinum* sont détectables en 8 heures. Il convient de remarquer que les micro-organismes cités ont en commun leur taux de croissance élevé. PREVITE a évalué le nombre de cellules présentes au moment de la détection : selon cet auteur, ce nombre est dans de nombreux cas, suffisamment élevé pour rendre la culture trouble. A la même époque, WATERS (1972) applique la même méthode à la détection d'autres germes dans les aliments. Il remarque que le temps de détection est proportionnel au logarithme du nombre initial de cellules de contamination. Son étude porte sur les germes suivants cités par ordre décroissant de facilité de détection : *E. Coli*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella Typhimurium*, *S. aureus*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa*. Quelques cellules d'*E. coli* sont détectées en 8 heures alors que 10^6 à 10^7 sont détectées en 2 heures. Dans le cas de *P. aeruginosa*, quelques cellules

sont détectées en 15 heures et 10^7 cellules en 2 heures. Plus récemment encore, EVANCHO (1974) utilisant la même méthode radiométrique et étudiant plusieurs espèces de Clostridia annonce un temps de détection moyen de 10^4 cellules en 4 heures. LAMPI et coll (1974) généralisent la méthode radiométrique aux bactéries ne fermentant pas le glucose telles que *Alcaligenes faecalis* et *Pseudomonas aeruginosa*, en ajoutant au ^{14}C -glucose du ^{14}C - formate et du ^{14}C - glutamate. Après cette modification 10^5 cellules des germes cités sont détectés en 10 à 12 heures. Signalons enfin l'utilisation de la méthode radiométrique dans la détection de coliformes dans le lait à l'aide d'un milieu au ^{14}C -lactose. (FARREL J. et al 1967, KOGA et al 1970).

Le travail de HARRISON, WEBB et MARTIN (1974) qui cite notre première publication nous intéresse plus directement puisqu'il porte sur la détection rapide des contaminants dans la bière. Ces auteurs utilisent le milieu de culture de base suivant : yeast Nitrogen Base (Difco) 0,67 %, extrait de levure : 0,3 %, glucose : 1 à 2 %. Après ajustement du milieu à pH 6, le glucose marqué est ajouté de façon à conférer au milieu une activité spécifique de 4,5 ou 9 $\text{MC}_2/\text{m mole}$. Après inoculation dans le milieu du nombre de germes souhaité, la culture est incubée à 25° sans agitation. Le $^{14}\text{CO}_2$ produit lors de l'incubation est piégé par une solution d'hydroxyde de potassium. 0,1 ml de cette solution est introduit dans une fiole de scintillation afin d'en mesurer la radioactivité à l'aide d'un scintillateur. Les résultats relatifs à la détection des levures obtenus par ces auteurs sont remarquables puisque quelques dizaines de cellules de *S. cerevisiae* sont détectables en 15 heures et 10^4 cellules sont détectables en 4 heures. Par contre, la méthode ne semble pas applicable à la détection des bactéries : il faut en effet, selon les auteurs cités, 36 heures pour détecter 10^4 cellules de *Zyomonas anaerobia*. D'autre part, même après 36 heures d'incubation, il est impossible de détecter 10^4 cellules d'*Acetobacter rancens* et de *Lactobacillus fermenti*.

Deux lois quantitatives très nettes semblent se dégager des diverses techniques que nous venons de citer et qui ne sont que les variantes d'une seule méthode.

Tout d'abord, pour un temps d'incubation fixé, l'activité émise par les cellules sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ n'est pas proportionnel au nombre initial de cellules mais à son logarithme.

D'autre part, l'activité émise par les cellules varie selon une loi exponentielle avec le temps d'incubation ce qui s'explique aisément si on admet que l'activité émise reflète la croissance cellulaire. Il semble d'ailleurs que la méthode ne soit applicable qu'à la détection de germes à taux de croissance élevés, le signal émis par le dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ d'une cellule étant faible. Si la méthode radiométrique au $^{14}\text{CO}_2$ est très efficace pour la détection rapide de certains germes, sa faiblesse réside dans son incapacité de détecter certains germes tels que les bactéries de brasserie à croissance lente.

Avant d'étudier les méthodes radiométriques basées sur l'accumulation d'un métabolite marqué dans la cellule, signalons la méthode de YEE et coll (1958) mettant à profit la production de $^{35}\text{SH}_2$ par certains micro-organismes après incorporation de ^{35}S -Cystéine. Les auteurs annoncent la détection de 10^4 cellules de *Serratia marcescens* en trois minutes.

1.1.2 - Méthodes utilisant l'accumulation dans la cellule d'un métabolite marqué.

Une méthode utilisant l'assimilation de $^{14}\text{CO}_2$ par les bactéries photosynthétiques fut proposée par NIELSON (1963) pour la détection de la flore photosynthétique de la mer.

Toujours dans la perspective d'une détection rapide de la flore bactérienne de la mer, Mc LEOLD et coll (1966) proposent une méthode plus universelle. Elle consiste à incuber les cellules en milieu liquide contenant du phosphate inorganique marqué au phosphore 32 d'activité 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$. Les cellules ainsi marquées après incorporation du $^{32}\text{PO}_4$ sont isolées de la culture par filtration sur une membrane de 25 mm HA Millipore. Les membranes après rinçage sont séchées et font l'objet d'un comptage de radioactivité. Parallèlement, des blancs sont effectués afin de déterminer la radioactivité retenue par les membranes seules.

Les auteurs testant leur méthode sur une souche d'*Aerobacter aerogenes* constatent que l'activité retenue par les cellules est proportionnelle au nombre de cellules mises en jeu jusqu'à un certain seuil au-delà duquel l'activité diminue. Ils en concluent que le facteur limitant l'intensité du signal radioactif émis par les cellules marquées est la concentration de $^{32}\text{PO}_4$ d'où l'idée d'ajouter un entraîneur dans le milieu. Ils constatent alors que l'adjonction d'une quantité d'entraîneurs même infime, correspondant à 10 fois la concentration en phosphate habituellement présente dans le milieu, diminue sensiblement l'activité retenue par les cellules. La méthode est remarquablement sensible, du moins appliquée à la détection d'*Aerobacter aerogenes*, puisque les auteurs annoncent la détection de 23 cellules en une heure avec un risque d'erreur de 5 %. Néanmoins elle paraît difficilement applicable à des analyses de routine en raison de la brièveté de la période du ^{32}P (14,3 jours).

Notre méthode s'apparente à cette dernière mais présente certains éléments d'originalité qui seront précisés ultérieurement.

1-2 - Transport des aminoacides

L'insuffisance des modèles purement physicochimiques pour expliquer la pénétration des métabolites dans la cellule a été montrée il y a une vingtaine d'années. Le caractère actif de la perméation chez les bactéries fut alors mis en évidence (RICKENBERG et al 1956) et la notion de perméase introduite (COHEN et MONOD 1957). Un peu plus tard, cette notion de perméase fut étendue aux autres micro-organismes, en particulier aux champignons (HALVORSON et COHEN 1958) (SURDIN et al 1964, 1965).

La complexité et le degré de spécificité des systèmes perméasiques chez les différents micro-organismes ont pu être mis en évidence grâce aux études cinétiques de pénétration des métabolites dans les cellules, à l'observation des phénomènes d'inhibitions compétitives à l'égard de la pénétration d'un composé par ses analogues structuraux, à l'isolement de mutants de perméation et enfin, à l'isolement de protéines présentant une haute affinité pour le métabolite étudié.

Dès 1955, l'existence "d'accepteurs spécifiques" pour les aminoacides chez *E. coli* est reconnue par COHEN et RICKENBERG, notamment pour la valine, la phénylalanine et la méthionine. Depuis, l'existence de deux sortes de perméases a été montrée chez les bactéries : les perméases communes à plusieurs acides aminés (AMES 1964, W.R. PENROSE et al 1968, K.D. BROWN 1970 et E.A. BERGER et al 1971), et les perméases spécifiques d'un seul aminoacide (BROWN 1970, E.A. BERGER 1971, FURLONG et WEINER 1970). Plus récemment, l'existence de plusieurs perméases assurant spécifiquement le transport d'un seul aminoacide ou d'un seul groupe d'aminoacides a été montrée pour l'histidine, les aminoacides aromatiques et le tryptophane (OXENDER 1972) et pour la leucine, l'isoleucine et la valine (GUARDOLA et al 1974) chez *E. coli* la signification biologique d'une telle multiplicité des transporteurs pour un seul substrat ne semble pas encore élucidée.

Le groupe des aminoacides basiques qui nous intéresse plus directement a fait l'objet d'études récentes chez les bactéries Gram négatives. La pluralité des systèmes perméasiques concernant les aminoacides a été établie par B.P. ROSEN (1971) et D.L. MILLER et V.W. RODWELL (1971). Une protéine liant l'histidine (B.P. ROSEN et F.D. VASINGTON 1970, 1971) (C.F. AMES et J. LEVER 1970) une autre liant à la fois l'arginine et l'histidine (ROSEN 1971) et une liant spécifiquement l'arginine chez *E. coli* (ROSEN 1973) ont été purifiées. L'implication de ces protéines dans le transport des aminoacides a été établie par ces auteurs.

Deux systèmes perméasiques ont été mis en évidence chez *E. coli* pour le transport de la lysine (ROSEN 1971). Le premier est spécifique. Le second (LAO) est commun à l'ornithine, la citrulline et, peut-être à d'autres précurseurs de l'arginine. Ce dernier système est inhibé par l'arginine bien qu'il n'assure pas le transport de cet aminoacide. Un système analogue a été découvert chez *Pseudomonas putida* (D.L. MILLER et V.N. RODWELL 1971) à la différence près que c'est l'arginine qui possède son transporteur spécifique. Le transport de l'arginine n'est alors ni inhibé par la lysine, ni par l'histidine, ni par les précurseurs de l'arginine. Par contre, la lysine dont le transport est pris en charge par le système perméasique commun LAO voit son entrée inhibée par l'arginine. On observe une répression totale du système LAO chez les cellules poussant sur milieu riche.

Le transport actif, du moins chez certaines bactéries, n'est pas la seule voie de pénétration des aminoacides. Il est connu depuis longtemps que *Staphylococcus aureus* est peu sensible aux agents découplants tels que le TCS (E.F. GALE 1954 - W.A. HAMILTON 1968).

Le mécanisme osmotique proposé par MITCHELL (1966) suppose d'une part, que le transport des cations est dirigé par le potentiel chimique de la membrane (dont la face interne est chargée négativement). D'autre part, le transport des anions est dirigé par le gradient de pH régnant à travers la membrane (la face interne étant la plus alcaline). Suivant ce mécanisme, le transport des métabolites serait lié à un "cotransport" de protons = c'est ainsi que les sucres neutres, liés à des protons, formeraient une entité positive dont l'accumulation dans la cellule serait expliquée à la fois par le potentiel chimique de la membrane et par le gradient de pH (P. MITCHELL 1970 et V.P. SKULACHEN 1972). L'accumulation de la lysine chez *Staphylococcus aureus* obéit à ce modèle (D.F. NIVEN, R.E. JEACOCKE et W.A. HAMILTON 1973). A pH neutre, la lysine se trouvant sous forme de cations se comporte comme un ion monovalent et est échangée contre les ions potassium intracellulaires suivant un équilibre de Donnan. Les derniers auteurs cités ont montré qu'une diminution du potentiel chimique par adjonction de chlorure de potassium (100 mM) dans le milieu provoquait un efflux important de lysine. Une fraction importante cependant de la lysine est insensible à cet efflux et reste à l'intérieur de la cellule, ce qui suggère l'existence de deux pools de lysine : l'un échangeable, le second fixé à un matériel comportant des sites chargés négativement, peut-être le DNA. D'autre part, à pH voisin du point iso-électrique de la lysine, on observe un net ralentissement de l'entrée de cet aminoacide dans la cellule. Il est probable que cette entrée de lysine à faible vitesse masque en réalité un efflux massif de lysine à faible activité spécifique en équilibre avec un influx de ^{14}C -lysine à haute activité spécifique.

La spécificité des perméases chez les levures n'a été établie que plus tardivement. Cette spécificité est d'ailleurs beaucoup moins poussée que chez les bactéries. De nombreux cas d'inhibition du transport d'un aminoacide par presque tous les autres ont été signalés (HALVORSON et COHEN 1958, SURDIN et al 1964, 1965). Les derniers auteurs cités ont

démontré le caractère enzymatique du transport des aminoacides chez *S. cerevisiae* et attribué la régulation de ce transport à un seul système perméasique (AAP) dont ils ont étudié les propriétés. Selon ces auteurs, l'AAP obéit à la loi d'Henry-Michaelis et établit à l'intérieur de la cellule un pool échangeable d'aminoacides. D'autre part, un mutant AAP déficient a été isolé et manifeste une réduction de l'activité perméasique d'environ 10 fois pour l'ensemble des aminoacides.

Par la suite, des perméases spécifiques ont été mises en évidence chez *S. Cerevisiae*. Tout d'abord, l'existence d'une perméase partiellement spécifique pour l'arginine et commun à l'ornithine et à la lysine a été établie (GRENSON et al 1966). Un mutant arg. p1, imperméable à l'arginine et résistant à la canavanine a été isolé. Ce mutant se comporte normalement vis à vis des acides aminés non basiques. Le mode de transport de la lysine chez *S. Cerevisiae* n'est pas sans analogie avec celui des bactéries. Le transport de la lysine est en effet dans ce cas également soumis à deux systèmes perméasiques : l'un hautement spécifique ($K_m = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$), l'autre étant la perméase commune à l'arginine que nous venons de citer et dont l'affinité pour la lysine est beaucoup plus faible. ($K_m = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$).

L'existence de système de transporteurs spécifiques a été longtemps masqué par le fait qu'en l'absence d'ions ammonium, on observe une disparition de toute spécificité. On enregistre alors une augmentation notable de l'incorporation de tous les aminoacides (BENKO et AL 1967, PALL 1969, GRENSON et al 1970). Les aminoacides sont soumis à des inhibitions compétitives limitées laissant subsister des activités voisines de celles qui ont lieu en présence d'ions ammonium. D'autre part, en présence d'ions ammonium, les cellules cumulant les deux mutations arg. p1 et Lys-p1 n'incorporent qu'une quantité négligeable de lysine. GRENSON (1970) interprète ces observations en invoquant l'existence d'une perméase générale (gap) concernant les aminoacides neutres et basiques mais non la proline. Cette perméase générale est constitutive et inhibée par les ions ammonium. D'autre part, lorsque la proline est utilisée comme source d'azote en l'absence d'ammonium, la gap et les perméases spécifiques semblent fonctionner simultanément. En effet, dans ce cas, chez les mutants Arg. p1 - Lys.p1,

L'incorporation des aminoacides s'inhibant mutuellement de façon compétitive se passe normalement. Un peu plus tard, GRENSON et al (1972) ont précisé le mécanisme de régulation du transport de aminoacides par NH_4^+ : un mutant résistant à l'inhibition de NH_4^+ et dont l'activité de la glutamate deshydrogénase anabolique liée au cofacteur NADPH était bloquée a été isolé (mutant gph - A). Selon les auteurs, le blocage de la gph-A réduisant la taille du pool des aminoacides endogènes serait compensé par la levée de l'inhibition de la gna par NH_4^+ . L'effecteur direct de l'inhibition ne serait pas NH_4^+ mais probablement le cofacteur NADPH.

Il semble donc que le rôle essentiel de la gpa serait d'assurer l'entrée des métabolites servant de sources d'azote. Les perméases spécifiques assureraient les besoins minimum en aminoacides pour les synthèses protéiques même lorsque la gna est bloquée.

L'originalité du comportement des levures à l'égard de la lysine a fait l'objet d'une revue récente (BOURGEOIS 1973). Tout d'abord, la lysine ne constitue pas une source d'azote suffisante pour la croissance de la plupart des espèces du genre *Saccharomyces*, qui peuvent cependant l'assimiler en présence d'une autre source d'azote. On a vu que cette absence d'utilisation de la lysine en tant que source d'azote ne tenait pas à une mauvaise entrée dans la cellule. Bien au contraire, la lysine s'accumule de façon intense dans la cellule de levure (G. SVIHILA et al 1963, BOURGEOIS 1969). Cette pénétration elle-même est particulière puisqu'elle n'est pas entravée par la présence dans le milieu d'ions NH_4^+ qui pourtant bloquent l'entrée des autres aminoacides (BOURGEOIS 1969, F. RAMOS et al 1970). L'explication d'une telle particularité du comportement des levures vis à vis de la lysine n'est pas claire et reste à étudier. ROMKES et LEWIS (1971) ont montré que, contrairement à ce qui se passe pour d'autres aminoacides, la pénétration de la lysine n'est l'objet d'aucune phase de latence et n'est guère influencée par l'âge de la culture.

D'autres renseignements intéressants ont été obtenus : les concentrations atteintes dans différentes conditions de croissance ont été précisées (BOURGEOIS 1969) ; il a été démontré que la lysine peut jouer un rôle important dans la régulation du métabolisme post-exponentiel (BOURGEOIS et THOUVENOT 1970, BOURGEOIS 1972) ; enfin, le dernier auteur cité a confirmé que la proportion de lysine dégradée était infime, ce qui

a l'intérêt, lors de la mise en oeuvre de la méthode dont a fait l'objet notre travail, d'éviter qu'une partie du ^{14}C de la lysine ne soit libérée sous la forme de $^{14}\text{CO}_2$.

Les propriétés de la lysine la rendent donc particulièrement apte à l'utilisation prévue.

o

o

o

TECHNIQUE ET CARACTERISTIQUES DE LA METHODE2.1 - Mise au point technique

Mes premiers essais relatifs à la mise au point technique de la méthode d'analyse ont été largement orientés par les travaux préliminaires de D. THOUVENOT effectués sous la direction de Cl. BOURGEOIS.

D'autre part, ces essais ont été effectués dans la perspective d'une détection rapide des levures, principal objectif de la méthode étudiée. Le problème de la détection des bactéries n'ayant été envisagé qu'après la mise au point de la technique d'analyse des levures, nous l'aborderons dans le chapitre III relatif à l'optimisation de la technique.

2.1.1. - Techniques microbiologiques générales

Deux souches de levures basses fournies par TEPRAL (S.CARLSBERGENSIS 2285 et 1522) nous ont servi d'organismes test. Des raisons géographiques (proximité de la brasserie de Champigneulle puis de la brasserie S.E.B. de Brest) nous ont incités à étudier plus spécialement la souche 1522 utilisée dans les brasseries de la S.E.B.

Les premiers essais intéressant strictement la technique de mise en oeuvre de la méthode d'analyse ont été réalisés dans des conditions de laboratoire, sans soucis d'écologie industrielle. L'analyse était alors effectuée sur de la levure cultivée sur milieu synthétique et généralement prélevée en phase exponentielle.

Le milieu synthétique utilisé pour ces précultures avait la composition suivante :

. Glucose	50 g
. Sulfate d'ammonium	1,32 g
. Sulfate de magnésium	2,5 g

. Chlorure de sodium	0,5 g
. Chlorure de calcium	0,5 g
. Phosphate disodique	11,21 g
. Phosphate monopotassique	2,5 g
. Solution d'oligoéléments force 100 *	50 ml
. Solution de vitamines force 1000 *	5 ml
(s.p. 1 000 ml)	

Ce milieu, après stérilisation par filtration, était réparti à raison de 100 ml dans des fioles d'Erlenmeyer de 300 ml, bouchées au coton.

Les précultures étaient incubées sous agitation sur un plateau rotatif à faibles oscillations, à 28°C, en atmosphère saturée.

La récolte s'effectuait à un stade variable indiqué dans le texte pour chaque essai. Les cellules recueillies sur une membrane Millipore étaient rincées sur cette membrane et remises en suspension dans du liquide de Ringer.

La concentration cellulaire de la suspension était mesurée par turbidimétrie à l'aide d'un colorimètre Beckmann, modèle C, à 660 nm, dans des tubes calibrés, l'étalonnage préalable ayant été effectué par référence à des comptages microscopiques à l'hématimètre.

L'ajustement à la concentration souhaitée s'effectuait ensuite par dilutions en série. Les suspensions finales utilisées pour l'analyse étaient contrôlées par inclusions en milieu gélosé fondu et refroidi à 45° C.

2.1.2. - Choix du milieu de culture de détection

• 2.1.2.1. - Milieu de base

Trois impératifs ont présidé au choix du milieu de base utilisé pour la culture des contaminants à analyser :

- contrôle rigoureux de la composition du milieu favorisant la reproductivité des analyses, d'où la préférence pour un milieu synthétique.

* D'après L. J. WICKERHAM,

- absence dans le milieu de sources d'azote susceptibles d'inhiber totalement ou partiellement l'entrée de l'acide aminé marqué dans la cellule.

- préparation rapide et simple compatible avec une utilisation de routine.

Le milieu adopté est le "Yeast Carbon Base" de WICKERHAM.

• 2.1.2.2. - Choix du substrat marqué

La plupart des essais ont été effectués en utilisant comme substrat des acides aminés marqués au ^{14}C , choisis parmi ceux susceptibles d'être absorbés rapidement par la cellule de levure : l'acide glutamique, plaque tournante du métabolisme azoté ; l'arginine, remarquable par sa concentration intracellulaire élevée en phase exponentielle, la lysine qui s'accumule sous forme libre dans la vacuole et la méthionine qui s'y accumule sous forme de S. adénosyl-méthionine ; un mélange d'acides aminés a également été testé.

De ces essais, il est résulté que seuls l'arginine et la lysine étaient absorbés de façon assez intense pour se prêter à l'utilisation prévue.

Les expériences suivantes ont donc été faites avec l'un ou l'autre de ces acides aminés utilisés à une concentration voisine de 1 micromolaire, pour une radioactivité totale par échantillon de $0,2 \text{ } \mu\text{Ci}$.

La lysine a été finalement choisie pour sa plus grande vitesse d'absorption par les cellules prélevées en fin de garde (fig. 1). L'acide aminé marqué fourni par le C.E.A., est introduit dans le milieu de culture à raison d'une activité de $0,2 \text{ } \mu\text{Ci}/\text{ml}$, pour une concentration de l'ordre de 1,5 micromolaire.

x (i.p.m.)

100

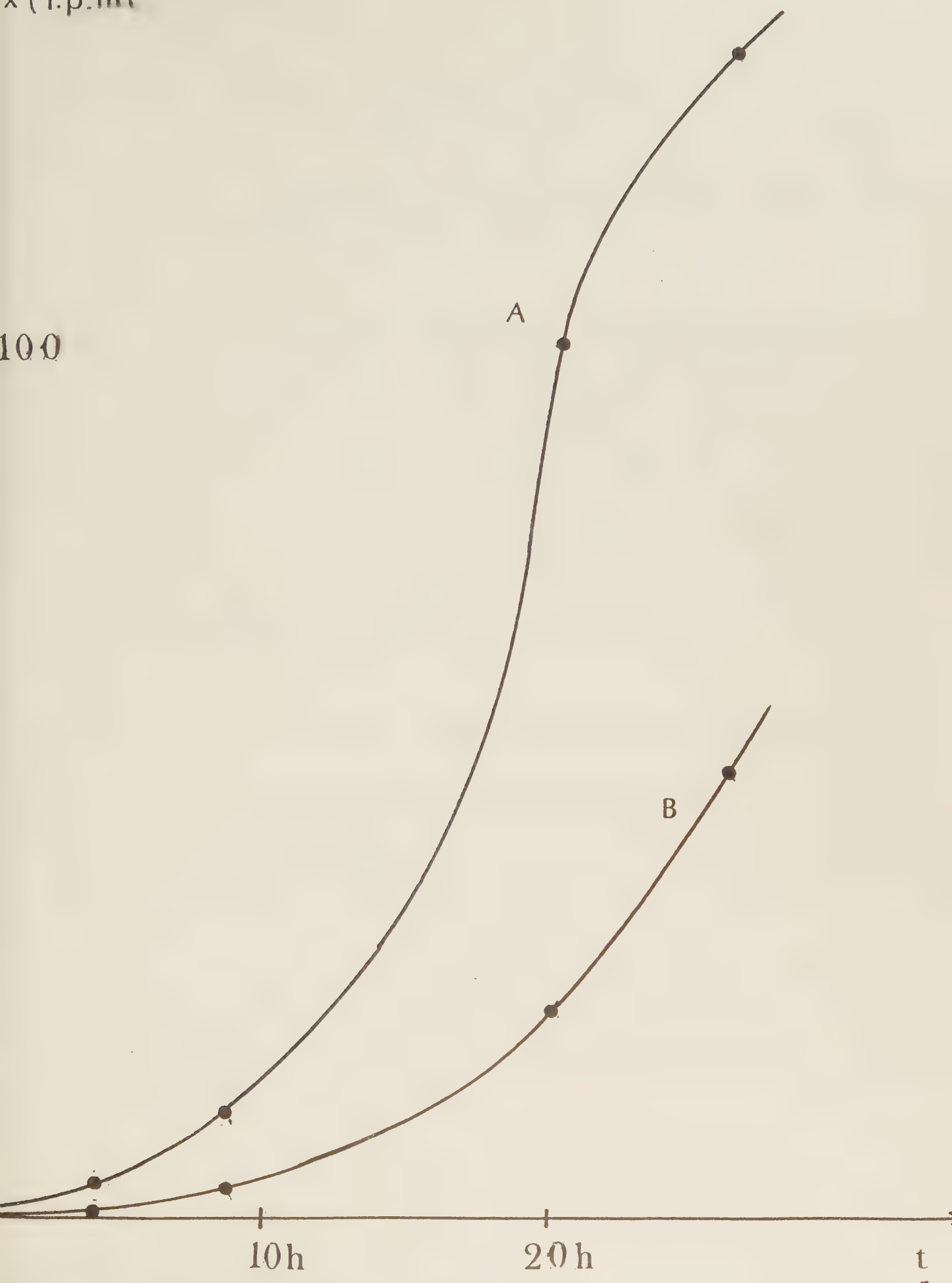


Figure 1 : Cinétiques d'incorporation - 3000 cellules (détermination turbidimétrique) prélevée dans la bière après filtration.
Courbe A : ^{14}C -lysine + $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 0,01 mM - Courbe B: ^{14}C -arginine pas de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$

2.1.3. - Méthode d'analyse

Avant de détailler chaque phase du protocole d'analyse, résumons en le principe illustré par la figure 2.

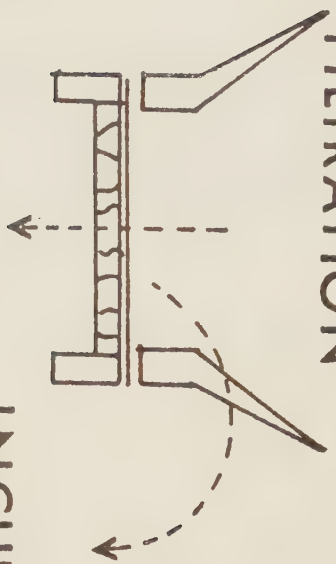
L'échantillon à analyser est d'abord passé sur membrane filtrante qui retient les cellules présentes. Celle-ci est ensuite appliquée sur un carton absorbant imbibé de liquide nutritif contenant la lysine marquée. Après une incubation de quelques heures à 28° C, la membrane est remplacée dans un système de filtration pour y subir un rinçage destiné à éliminer toute la radioactivité, à l'exception de la radioactivité intracellulaire. Enfin, cette même membrane est séchée et introduite dans une fiole de scintillation pour y subir une mesure de radioactivité dans un compteur à scintillation liquide. Ces conditions étant rigoureusement standardisées, la radioactivité mesurée renseigne sur l'importance de la contamination.

• 2.1.3.1. - Conditions de filtration et d'incubation

- Les membranes filtrantes Millipore ont été choisies au diamètre standard de 47 mm, à la porosité de 0,8 μ permettant la filtration sans problème d'un volume de un litre de bière claire. Nous avons de plus vérifié que cette porosité ne permettait pas le passage des bactéries à travers la membrane filtrante.

D'autre part, afin de permettre ultérieurement un rinçage complet de toute la surface de la membrane filtrante ayant été en contact avec le milieu radioactif, les membranes sont munies de bords hydrophobes de 6 mm d'épaisseur et posées sur un tampon absorbant de diamètre inférieur à celui de la membrane (37 mm).

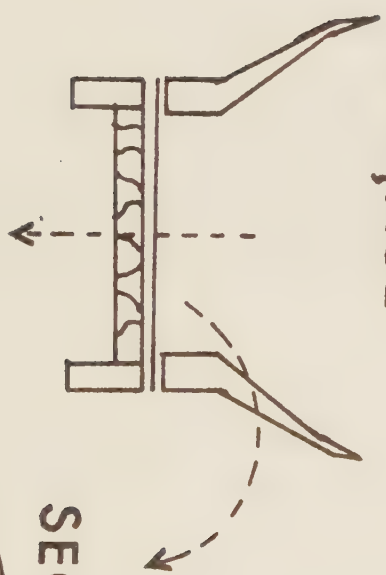
FILTRATION



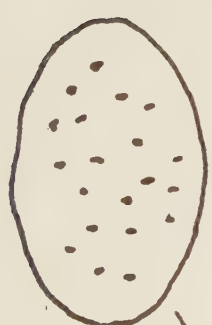
INCUBATION



RINÇAGE



SECHAGE



COMPTAGE



- L'appareil de filtration Millipore est en acier inox et permet des stérilisations fréquentes, soit à l'eau bouillante, soit à l'alcool enflammé.

Il a été montré (THOUVENOT et BOURGEOIS)* que le rinçage des membranes après passage de la bière n'était pas nécessaire, les traces de lysine pouvant rester absorbées sur la membrane ne diluant pas sensiblement la lysine marquée.

- L'incubation a lieu à 28° C, les boîtes de Pétri étant hermétiquement closes.

2.1.3.2. - Conditions de rinçage

Le bain de rinçage est une solution de détergent alcalin (DDN 150) et d'entraîneur :

. Lysine monochlorhydrate	200 mg
. D.D.N. 150	20 ml
. Eau	q.s.p. 1 l.

• Le pH de la solution de rinçage, compris entre 11 et 11,5, nous est apparu satisfaisant. D. THOUVENOT a en effet montré que le rinçage de la membrane était d'autant plus efficace que le pH du bain était plus élevé.

D'autre part, élever exagérément le pH de la solution de rinçage risquait de provoquer la sortie des acides aminés des cellules, c'est pourquoi nous avons adopté le pH de la solution sans modification.

• La température du bain de rinçage n'a aucune influence sur l'efficacité du rinçage, du moins dans la zone de température testée (5° C à 28° C).

• Le volume de rinçage utilisé est 200 ml. Au-delà de ce volume, l'efficacité du rinçage n'augmente plus sensiblement.

* non publié

• Le dispositif de filtration Millipore permet un rinçage de toute la surface centrale non hydrophobe de la membrane filtrante, le cercle de sertissage de l'entonnoir de filtration se trouvant sur la bande périphérique hydrophobe de la membrane.

2.1.3.3. - Comptage de l'activité des échantillons

Les membranes rincées sont d'abord grossièrement séchées sur une feuille de papier filtre, introduites dans une fiole de scintillation et séjournent pendant un quart d'heure dans une étuve à 100° C afin de compléter le séchage. Le quenching engendré par les membranes ainsi séchées est extrêmement faible.

Le liquide scintillant utilisé à la composition suivante :

. P.P.O.	5 g
. P.O.P.O.P.	0,1 g
. Toluène	q.s.p. 1 l

Le comptage s'effectue dans un spectromètre à scintillation liquide jusqu'à totalisation de 4000 i.p.m au moins par échantillon, ce qui correspond à un coefficient de variation inférieur à 2 %.

D'autre part, il a été montré (THOUVENOT et BOURGEOIS* que la position de la membrane dans la fiole de scintillation avait un effet négligeable.

2.1.4 - Problème du bruit de fond

Le bruit de fond C_0 des signaux mesurés au scintillateur résulte du mouvement propre de l'appareil et de l'activité résiduelle retenue par la membrane seule après rinçage.

L'intensité du bruit de fond C_0 constitue une variable aléatoire de moyenne $\bar{C}_0$ et d'écart type σ , ces paramètres variant avec le temps d'incubation.

* non publié.

2.1.4.1. - Etude de la distribution des bruits de fond pour un temps d'incubation de 9 heures.

Nous avons estimé les paramètres de distribution des bruits de fond pour le temps d'incubation de 9 heures en réalisant 67 essais blancs (c'est-à-dire filtration de liquide de Ringer stérile, incubation sur tampon imbibé de milieu marqué et rinçage suivant les conditions marquées plus haut).

Distribution obtenue

: C _o :	180	181-210	211-240	241-270	271-300	301-330	330
: (i.p.m):							
: Nombre :	11	6	11	20	11	4	4

Moyenne : $\bar{C}_o = 247,4$

Variance expérimentale $\sigma^2 = 3\ 039$

Estimation de la variance de la distribution :

$$\hat{\sigma}^2 = 3\ 039 \times \frac{67}{66} = 3\ 085$$

Estimation de l'écart type : $\hat{\sigma} = 55,5$

Coefficient de variation : 22,4 %

On est en droit de considérer que cette distribution est de type normal. Le test de raccordement de la distribution à une loi normale est en effet largement positif puisque nous obtenons $\chi^2 = 5,22$, (la valeur du χ^2 permettant d'exclure l'hypothèse d'une distribution normale à un risque d'erreur de 5 % étant de 9,48).

Compte tenu du fait que l'activité mise en jeu dans chaque échantillon est de l'ordre de 440 000 i.p.m. on peut estimer que le niveau des bruits de fond est très satisfaisant.

Par contre, la dispersion des bruits de fond, vraisemblablement due en grande partie aux fluctuations du degré de saturation en milieu radioactif des tampons absorbants, réduit largement l'acuité de la détection des contaminants, le seuil de détection étant lié d'une part à l'écart type de distribution des bruits de fond, d'autre part à l'activité retenue par chaque cellule.

Nous avons pu obtenir une réduction intéressante de la dispersion des bruits de fond en augmentant le volume de rinçage des membranes (500 ml au lieu de 200 ml). Dans ces conditions, on observe une diminution sensible de l'écart type de la distribution bien que la valeur de la moyenne reste inchangée.

Distribution obtenue

C _o	180	181-210	211-240	241-270	271-300	301-330	330
nombre	0	0	9	9	2	2	0

Moyenne : $\bar{C}_o = 253$

Variance expérimentale $\sigma^2 = 967,5$

Estimation de la variance réelle de la distribution :

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{22}{21} \times 967,5 = 1\,013,5$$

Estimation de l'écart type : $\hat{\sigma} = 31,8$

Coefficient de variation : 12,5 %

Le test d'homogénéité par la variable de Snédécour permet d'affirmer que la différence entre les variances des deux distributions est très significative.

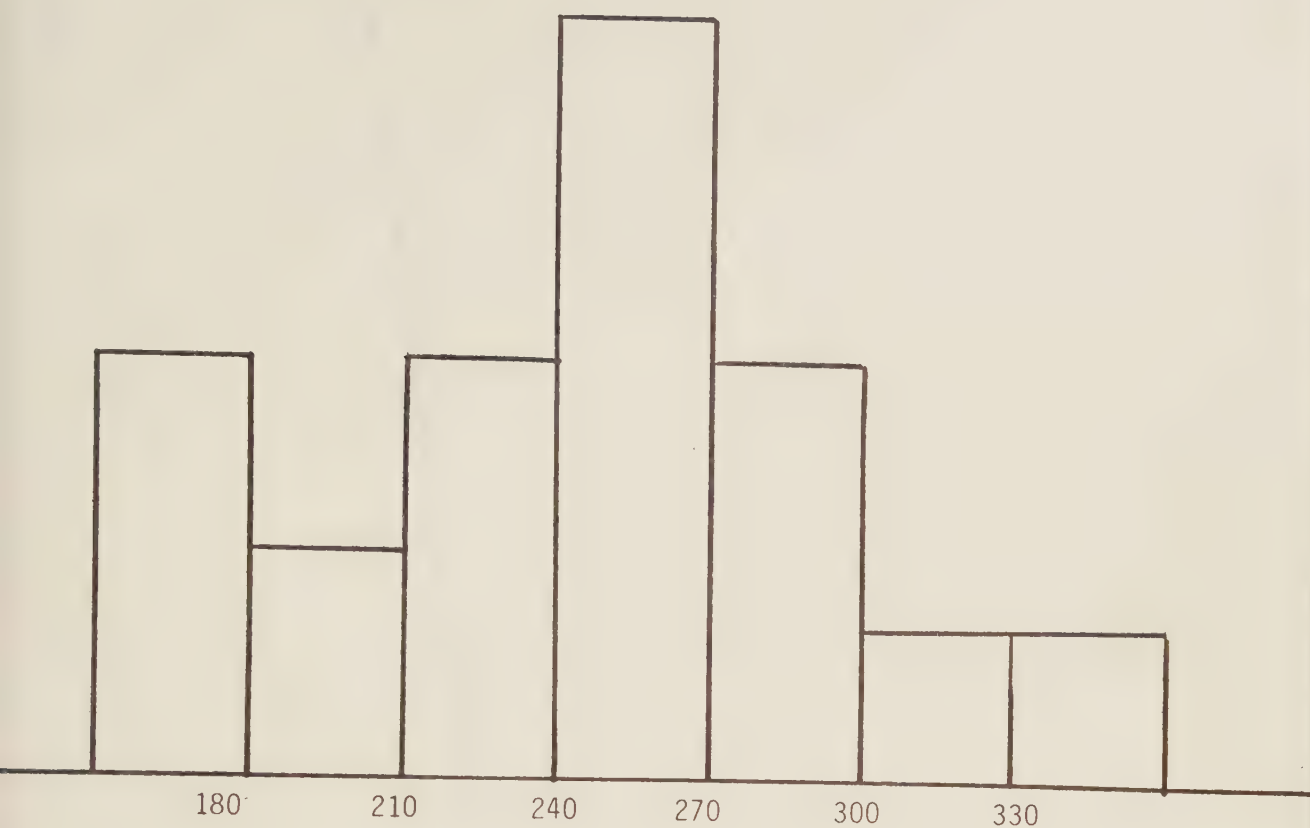
Dans ces conditions, on peut dire que le fait de rincer les membranes par 500 ml de bain de rinçage au lieu de 200 ml améliore l'acuité de la détection d'un facteur d'environ 1,75.

2.1.4.2. - Variations du niveau des bruits de fond en fonction du temps d'incubation.

A partir de deux mesures du bruit de fond par temps d'incubation, nous avons établi la courbe d'étalonnage $C_o = f(t)$ (fig. 5).

Taille de l'échantillon : 67

Figure 3



Taille de l'échantillon : 22

Figure 4

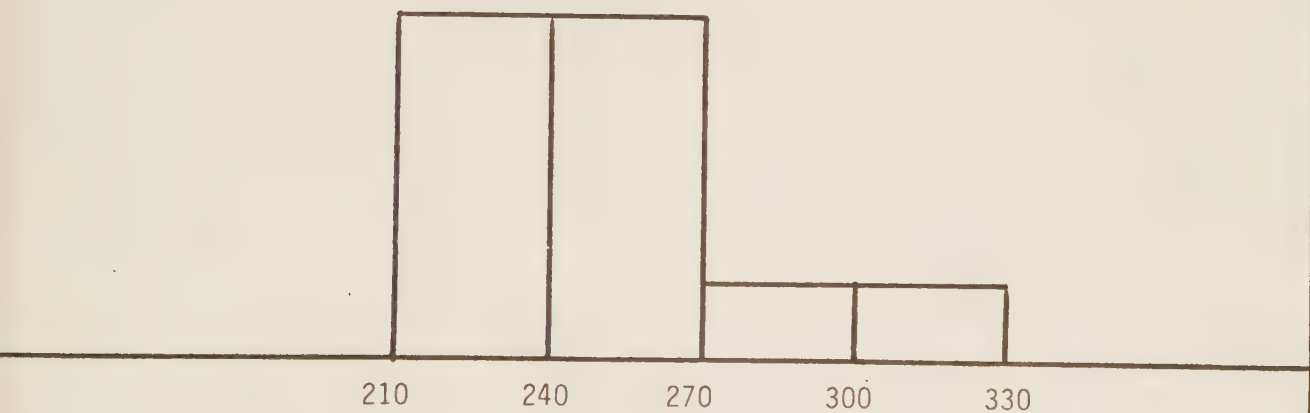
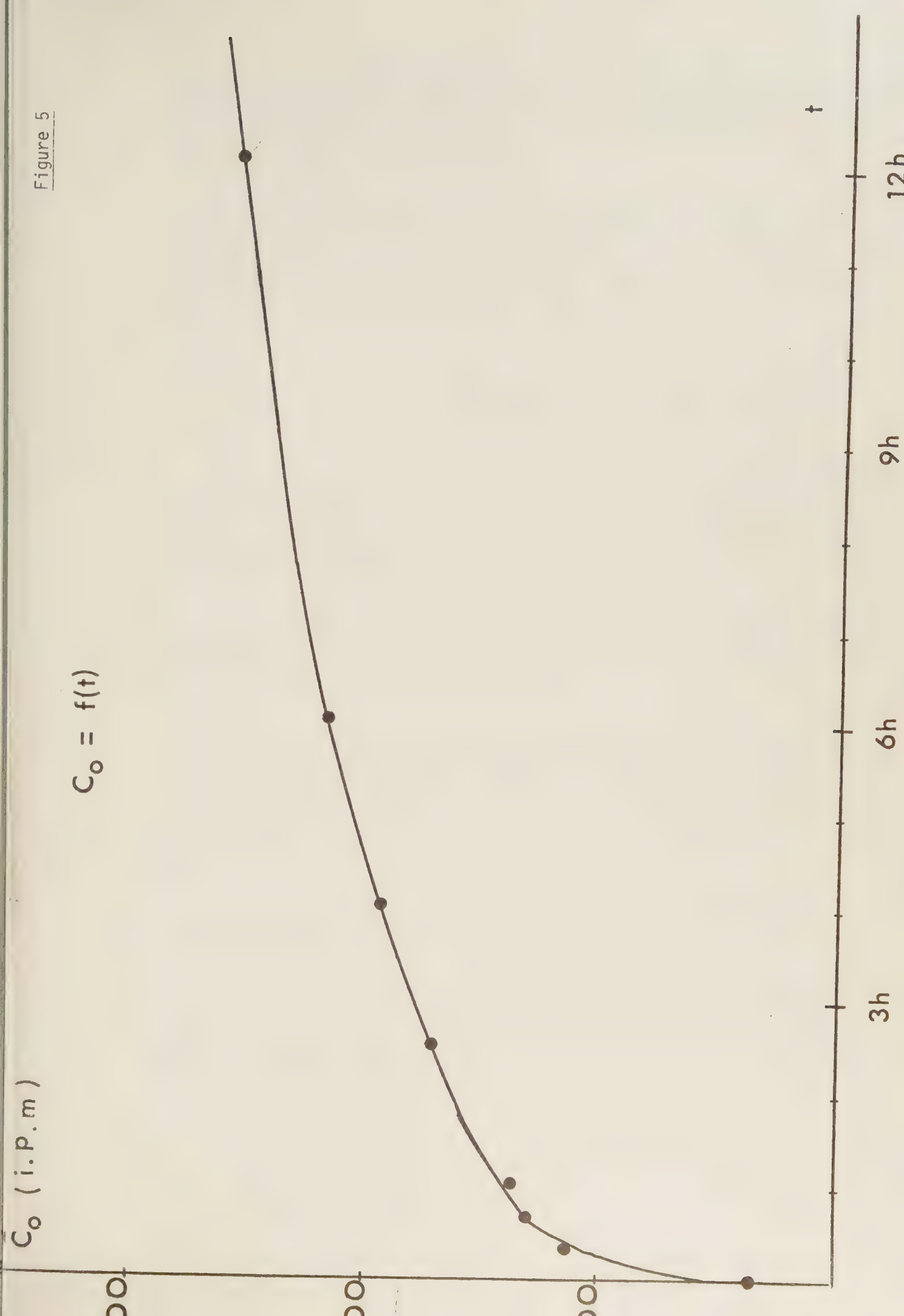


Figure 3 : Distribution des valeurs des bruits de fond pour un temps d'incubation de 9 heures et pour un volume de rinçage de 200 ml.

Figure 4 : Distribution des valeurs des bruits de fond pour un temps d'incubation de 9 heures et pour un volume de rinçage de 500 ml.

Figure 5



On voit ainsi que lorsque l'intensité du signal émis par les contaminants n'est pas largement supérieure à la valeur des bruits de fond, il est nécessaire de tenir compte des variations du niveau des bruits de fond en fonction du temps d'incubation.

Pour les temps d'incubations inférieurs à 1 heure la valeur du bruit de fond varie rapidement. Dans ces conditions, il faut que l'activité retenue par les cellules soit nettement supérieure à la valeur du bruit de fond pour obtenir un résultat significatif.

2.1.4.3. - Notions d'activité critique et de seuil de détection.

Les fluctuations des valeurs des bruits de fond entraînent une incertitude quant à leur contribution réelle dans l'activité totale mesurée, ce qui pose le problème de la détermination du niveau d'activité à partir duquel un échantillon peut être estimé contaminé.

On est donc amené à envisager la classification des échantillons en échantillons sains et en échantillons contaminés, non pas en termes de certitude, mais en termes de probabilités.

Si l'on admet un risque d'erreur de 5 % dans la décision de refuser un échantillon présumé contaminé, il est possible de déterminer la valeur limite de l'activité mesurée à partir de laquelle on conviendra que l'échantillon est contaminé, connaissant les paramètres de distribution des bruits de fond.

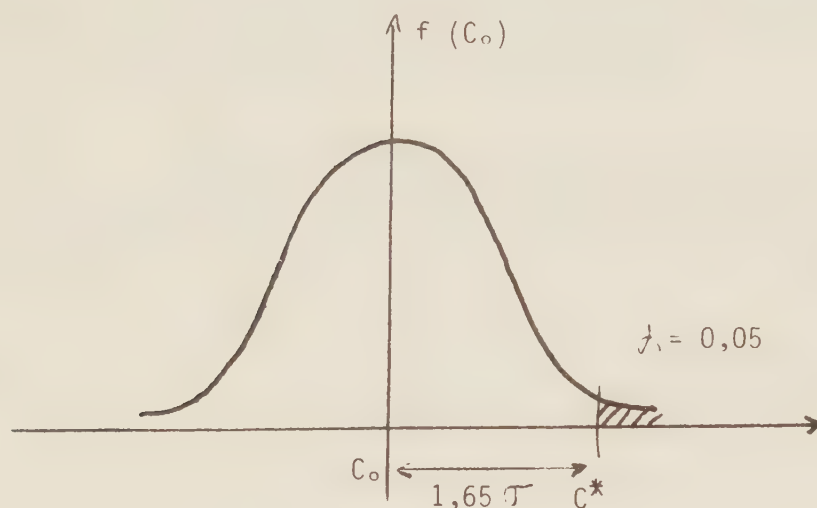
Dans la suite de l'exposé, nous appellerons cette valeur limitée "activité critique" et nous la noterons C^* .

L'activité critique est donc la radioactivité mesurée d'un échantillon à partir de laquelle celui-ci sera déclaré contaminé avec un risque de première espèce de 5 %.

Il est clair que cette activité est définie pour un temps d'incubation donné.

En retenant l'hypothèse d'une distribution normale des bruits de fond de moyenne C_0 et d'écart type σ , l'activité critique sera donnée par la relation :

$$C^* = C_0 + 1,65 \sigma$$



Ne disposant que des estimations des paramètres de la distribution : $\bar{C}_0$ et $\hat{\sigma}$, on écrira :

$$C^* = \bar{C}_0 + 1,65 \hat{\sigma}$$

Ainsi, pour le temps d'incubation de 9 heures et pour des membranes rincées avec 200 ml de solution, nous obtenons

$$\begin{array}{l} \bar{C}_0 = 247,4 \\ \hat{\sigma} = 55,5 \end{array} \Longrightarrow C^* = 339$$

Bien entendu, ces valeurs dépendent du mouvement propre du scintillateur. Celui que nous avons utilisé à Nancy ayant un mouvement propre de 34 i.p.m., on peut exprimer plus généralement les valeurs des activités critiques citées en exemple plus haut et correspondant à un scintillateur quelconque de mouvement propre γ de la façon suivante :

$$\begin{aligned} C^* &= 305 + \gamma \\ \text{et } C^* &= 271 + \gamma \end{aligned}$$

Parallèlement à la notion d'activité critique on est conduit à définir la notion de seuil de détection pour un temps d'incubation donné et pour une souche de micro-organisme donnée.

Nous conviendrons d'appeler seuil de détection N^* le nombre minimum de cellules devant être présentes dans un échantillon pour que la contamination de celui-ci ait 95 chances sur 100 d'être détectée.

Soient C l'activité mesurée d'un échantillon

C_0 la contribution du bruit de fond dans la valeur mesurée

N le nombre de cellules présentes dans l'échantillon

et posons
$$x = \frac{C - C_0}{N}$$

x correspond donc à l'activité retenue par une cellule mère et ses cellules filles au cours de l'incubation.

La condition pour qu'une contamination soit détectée dans un échantillon est :

$$C \geq C^* \iff C_0 + N x \geq C^* \iff N \geq \frac{C^* - C_0}{x}$$

La valeur limite de N correspondant au seuil de détection est donc :

$$N^* = \frac{C^* - C_0}{x} \quad (1)$$

$$\text{Or } C^* = \bar{C}_0 + 1,65 \sigma \quad (2)$$

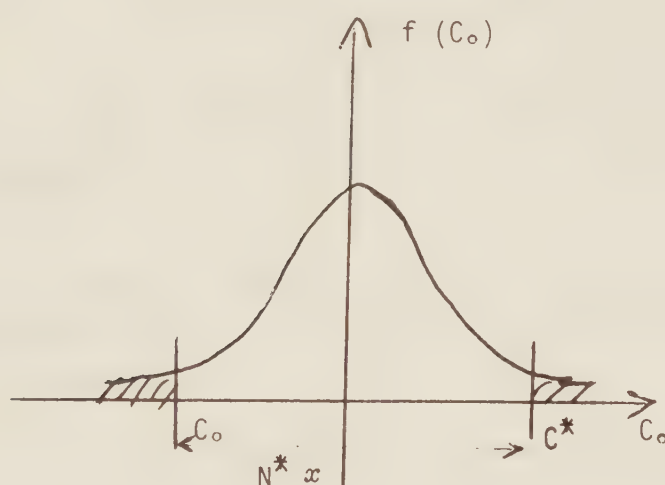
D'autre part, il y a 95 chances sur 100 pour que $C_0 \geq \bar{C}_0 - 1,65 \sigma$

En acceptant un risque de 5 % de ne pas détecter une contamination pourtant réelle, la valeur du bruit de fond la plus défavorable sera :

$$C_0 = \bar{C}_0 - 1,65 \sigma \quad (3)$$

En remplaçant C^* et C_0 par leurs valeurs dans l'équation (1), il vient :

$$N^* = \frac{3,3 \sigma}{x}$$



2.2 - Caractéristiques de la méthode

Comme l'indique le titre de ce travail, la principale qualité recherchée dans la mise en oeuvre de la méthode d'analyse étudiée est la rapidité des résultats, permettant son utilisation comme outil de décision.

Cette décision pouvant porter :

- sur le contrôle rapide d'une opération (filtration, pasteurisation)
- sur la classification rapide de lots de produit (par échantillonnages) en lots acceptables ou non.

Cet objectif restant prioritaire, nous nous sommes pourtant efforcés de doter la méthode d'une certaine sélectivité et d'une certaine quantitativité, cette dernière notion ne recouvrant pas exactement celle des méthodes de détection classiques.

2.2.1. - Décision

Quel que soit l'objet du contrôle guidant une décision, son processus reste toujours le même :

- Prélèvement de l'échantillon
- Mesure de son activité C
- Comparaison avec l'activité critique C^*

Si l'on obtient $C > C^*$, on conclura que l'efficacité de l'opération contrôlée est insuffisante ou que l'échantillon de produit à classer est contaminé.

Dans la mesure où la décision peut avoir des conséquences économiques importantes, l'utilisation d'une telle méthode appelle la plus grande prudence :

- Compte tenu du caractère aléatoire de tout échantillonnage (l'incertitude relative à la représentativité d'un échantillonnage étant d'ailleurs commun à toutes les méthodes d'analyse).
- Compte tenu des deux risques d'erreur qui existent nécessairement dans l'interprétation de résultats exprimés par une variable aléatoire. Dans le cas qui nous occupe :
 - Risque de conclure à la contamination d'un échantillon pourtant sain.
 - Risque de conclure qu'un échantillon est sain alors qu'il est contaminé en réalité.

Il nous paraît important d'examiner pratiquement dans quelle mesure ces deux risques d'erreur limitent l'efficacité de la méthode d'analyse étudiée.

• 2.2.1.1. - Risque d'erreur de première espèce

Le risque de décider à tort de mettre hors service un appareil fonctionnant correctement ou de jeter un lot de bière saine est certainement le plus redoutable pour un industriel.

Or l'analyse d'un échantillon parfaitement stérile a 1 chance sur 20 d'émettre un signal dont l'intensité dépasse l'activité critique. Il est clair qu'un tel risque est excessif.

Il est possible de réduire ce risque à $\left(\frac{5}{100}\right)^2$ en effectuant deux prises d'essais. Si le lot analysé est réellement stérile, les intensités des signaux correspondant aux deux échantillons n'auront plus qu'une chance sur 400 de dépasser simultanément l'activité critique.

Dans ces conditions, il paraît raisonnable de considérer qu'un lot est contaminé lorsque deux échantillons présentent simultanément des activités supérieures à l'activité critique.

• 2.2.1.2. - Risque d'erreur de seconde espèce

N étant le nombre de cellules se trouvant dans le volume de la prise d'essai, il apparaît que le problème du risque d'erreur de seconde espèce ne se pose que dans le cas où la valeur de N varie dans une fourchette relativement étroite.

Trois cas en effet peuvent se présenter :

a) $N < N^*$: le niveau de contamination de l'échantillon est inférieur au seuil de détection. Dans ce cas, seul peut exister le risque de considérer à tort que l'échantillon est contaminé, le risque inverse de ne pas détecter une contamination existant réellement étant évidemment exclu.

b) $N > 1,4 N^*$: dans ce cas, la non détection de la contamination est hautement improbable. En effet, la probabilité pour que la valeur du bruit de fond soit telle que $C_0 < \bar{C}_0 - 3\sigma$ n'est que de 0,13 %. Or pour qu'il y ait détection de contamination, il faut $C > C^* \Rightarrow C_0 + Nx > C^*$

Dans ce cas limite où $C_0 = \bar{C}_0 - 3\sigma$, il vient

$$\bar{C}_0 - 3\sigma + Nx > \bar{C}_0 + 1,65\sigma \Rightarrow N > \frac{4,65\sigma}{x}$$

$$\text{Or } x = \frac{3,3\sigma}{N^*}$$

Dans le cas hautement défavorable où

$C_0 = \bar{C}_0 - 3\sigma$, il suffit donc pour qu'il y ait détection de contamination que $N > 1,4 N^*$.

c) $N^* < N < 1,4 N^*$: Seulement dans ce cas, se pose le problème du risque de non détection d'une contamination réelle.

Ce risque est nécessairement inférieur à 5 %. Il reste toutefois la possibilité de réduire encore ce risque en effectuant deux prises d'essai. Si les deux analyses sont simultanément négatives (intensité du signal inférieur à l'activité critique), la probabilité pour que le lot analysé soit contaminé est inférieure à 1/400.

2.2.2. - Sélectivité et quantitativité

Il convient tout d'abord de remarquer que, dans la mesure où la méthode d'analyse étudiée est principalement destinée au contrôle de la pasteurisation de la bière et au contrôle de la filtration en fin de garde, sa vocation sélective et quantitative reste secondaire. Les micro-organismes à détecter étant généralement les levures de culture, il reste à ajuster leur temps d'incubation sur milieu marqué en fonction du seuil de détection souhaité, c'est-à-dire en fonction du niveau de contamination toléré.

Il était toutefois intéressant de tenter de généraliser la méthode à la détection des levures sauvages et des bactéries (cf. chapitre III où la question sera traitée), cette généralisation entraînant un problème de sélectivité.

D'autre part, lorsque le niveau de contamination est largement supérieur au seuil de détection, l'intensité du signal radioactif peut apporter une information quantitative originale qu'il serait dommage de négliger.

• 2.2.2.1. - Sélectivité

Dans la mesure où la croissance cellulaire joue un rôle prépondérant dans la valeur de l'activité retenue par les cellules, ce qui est démontré ultérieurement, chap. 3, les problèmes de sélectivité se posent ici dans les mêmes termes que dans le cas des analyses microbiologiques classiques.

La sélectivité pourra avoir pour origine :

- l'absence d'un ou plusieurs constituants nécessaire à la croissance des cellules dont on veut éviter la détection dans le milieu de culture. C'est, semble-t-il le cas du milieu de culture que nous utilisons pour la détection des levures à l'exclusion de celle de la plupart des bactéries.

- la présence d'un inhibiteur, par exemple d'actidione empêchant la croissance des levures, en particulier celle des levures de culture.

- les conditions physicochimiques de culture (température, pH, etc...).

Rapidité de détection et sélectivité posent le même dilemme que dans le cas des analyses microbiologiques classiques.

2.2.2.2. - Quantitativité

Lorsque le degré de contamination d'un échantillon dépasse nettement le seuil de détection, il est possible d'ajouter à la méthode de détection une dimension quantitative.

Afin d'évaluer l'importance d'une contamination en fonction de la radioactivité retenue par les cellules, nous avons été amenés à nous référer aux méthodes classiques par inclusion ou par filtration et incubation sur milieu gélosé riche (moût non houblonné ou milieu WL) couramment pratiquées en brasserie. N étant le nombre de cellules ainsi évalué, on en a déduit la radioactivité retenue par cellule initiale pour une souche de levure et pour un temps d'incubation donnés.

$$x = \frac{C - C_0}{N}$$

Il est clair que l'appréciation du niveau de contamination en termes de nombre de cellules n'est valide que dans la mesure où toutes les cellules appartiennent à la même souche, ce qui est le cas dans la plupart des utilisations prévues pour la méthode.

Dans le cas des mélanges de germes, la radioactivité retenue par une cellule initiale de chaque souche dépend :

- De la vitesse d'entrée de la lysine dans la cellule et de son pool intracellulaire à l'équilibre.
- Du temps de génération de la souche dans les conditions de culture pratiquées.

L'un des intérêts de la méthode étudiée réside donc dans le fait qu'une cellule donnera un signal d'autant plus intense qu'elle pousse rapidement et qu'elle est physiologiquement vigoureuse, d'où l'intérêt d'utiliser un milieu de sélectivité apparentée à celle de la bière.

Dans ces conditions, il apparaît plus intéressant et plus adapté à la technique utilisée de caractériser un niveau de contamination non par un nombre de cellules mais par une échelle reflétant l'activité biologique de la contamination.

L'unité de cette échelle pourra être "l'équivalent levure", c'est-à-dire le degré de contamination caractérisant la même activité biologique mesurée par la méthode radioactive qu'une contamination par une cellule de levure de culture.

CHAPITRE III

OPTIMISATION ET GENERALISATION DE LA METHODE

L'incorporation de la lysine mesurée au scintillateur est la résultante de deux phénomènes : la croissance cellulaire et le transport actif dont les exigences ne convergent pas forcément et sont parfois même difficiles à concilier. Le principal problème de l'optimisation puis de la généralisation de la méthode a résidé dans la difficulté de favoriser la croissance cellulaire sans défavoriser le transport actif de la lysine marquée.

3.1 - Optimisation de la méthode appliquée à la détection des levures de culture

Dans un premier temps, les essais relatifs à l'optimisation de la méthode ont été réalisés dans des conditions de laboratoire : cellules précultivées en milieu synthétique et prélevées en phase exponentielle. Par la suite, nous avons étudié le comportement des cellules prélevées en usine, en particulier en fin de garde.

3.1.1. - Essais réalisés sur cultures en phase exponentielle

Après le choix du milieu de culture (cf. chapitre II), nous avons montré (BOURGEOIS et al 1973) que la concentration en glucose entre 2 et 20 g/l sont sans effet sur l'incorporation de la lysine par les cellules, de même que les variations de pH entre 4,5 et 6,5. Nous avons également montré que l'addition de sulfate d'ammonium 0,01 millimolaire était défavorable à l'incorporation d'arginine mais favorable à l'incorporation

de lysine (fig. 6).

Cette dernière expérience nous a incité à poursuivre l'étude de l'influence de la source d'azote du milieu de culture sur l'incorporation de la lysine.

• 3.1.1.1. - Source d'azote

Une expérience illustrée par la figure 7 montre qu'il est avantageux d'utiliser une concentration de sulfate d'ammonium nettement plus élevée : 100 cellules initiales fixent 3 fois plus de ^{14}C - lysine à la concentration millimolaire qu'à la concentration 0,01 millimolaire.

Malgré ce résultat favorable, nous avons cherché à lever l'éventuelle inhibition partielle du transport actif de ^{14}C -lysine en remplaçant le sulfate d'ammonium par d'autres sources d'azote : l'aspartate et le glutamate réputés comme sources d'azote convenables pour la levure, et la proline dont on sait qu'elle n'inhibe pas la perméase générale du transport des acides aminés.

Les expériences dont la figure 8 rend compte montrent que la substitution des sources d'azote citées au sulfate d'ammonium n'est pas favorable.

• 3.1.1.2. - Effet de la concentration du substrat marqué

L'expérience rapportée plus haut (fig. 8) montre en outre que la radioactivité incorporée n'est pas proportionnelle au nombre de cellules, ce qui tient vraisemblablement à ce que la concentration en acide aminé marqué est insuffisante pour saturer son système de transport et que par suite la vitesse de marquage s'abaisse d'autant plus vite que la concentration cellulaire est plus élevée. Le K_m du système de transport de la lysine est en effet, selon Grenson (1966) de $2,5 \cdot 10^{-5}$ M, donc très supérieur à sa concentration dans le milieu utilisé. D'où l'idée d'étudier l'effet de la concentration du substrat marqué comme le montre la fig. 9, l'addition d'entraîneur améliore effectivement la linéarité de la relation $C - C_0 = f(N)$ mais la dilution corrélative du composé marqué diminue sensiblement la dose de radioactivité incorporée dans les cellules en un temps donné.

x (i.p.m) en 24h

$^{14}\text{C_LYS}$

25

$^{14}\text{C_ARG}$

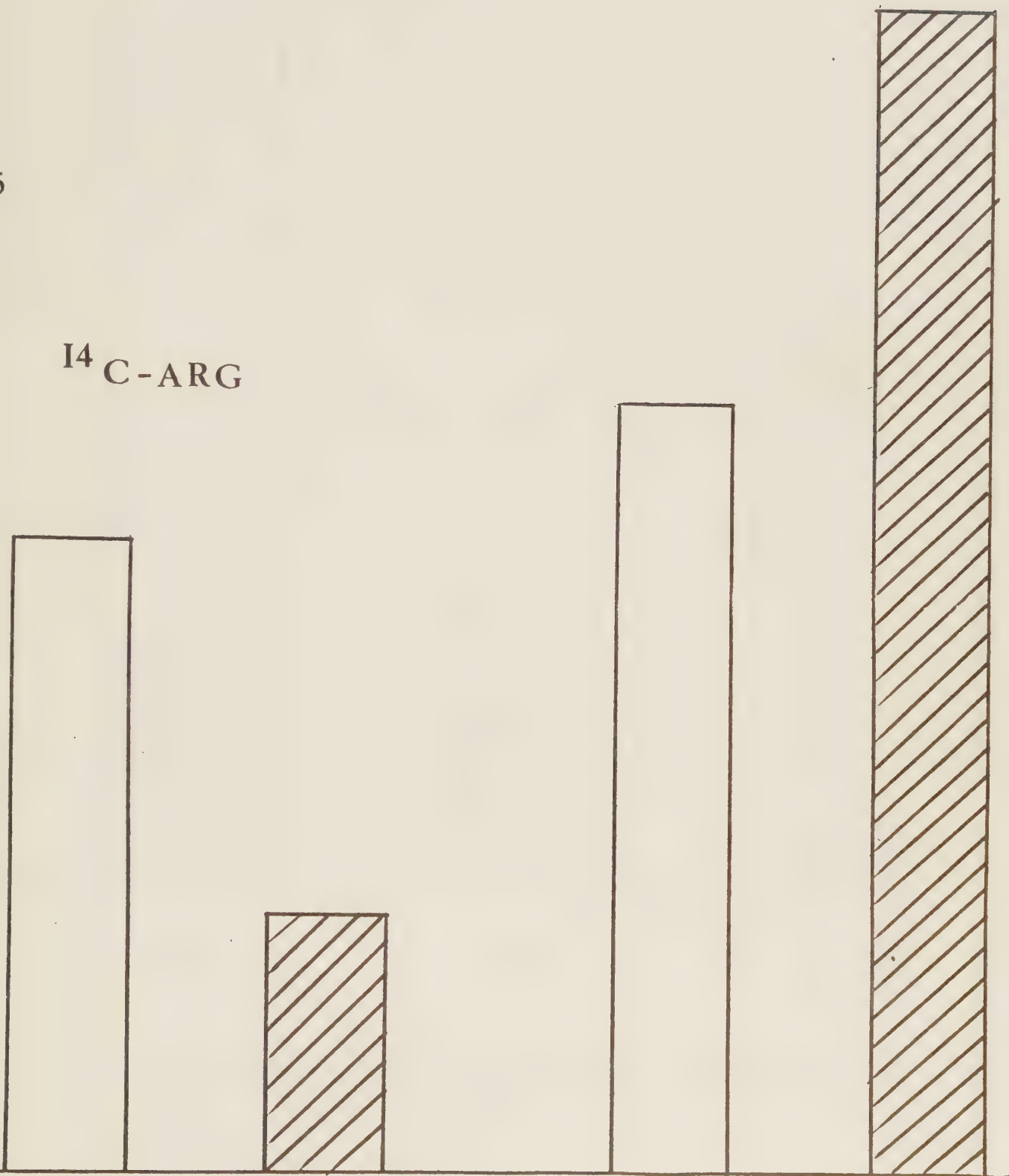


Figure 6 : Effet des ions ammonium sur l'incorporation - 5 000 cellules prélevées en phase exponentielle (détermination turbidimétrique)

. Zones non hachurées : milieu de culture sans NH_4^+

. Zones hachurées : milieu de culture avec $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01 mM

x (i.p.m) en 24 h

. 100

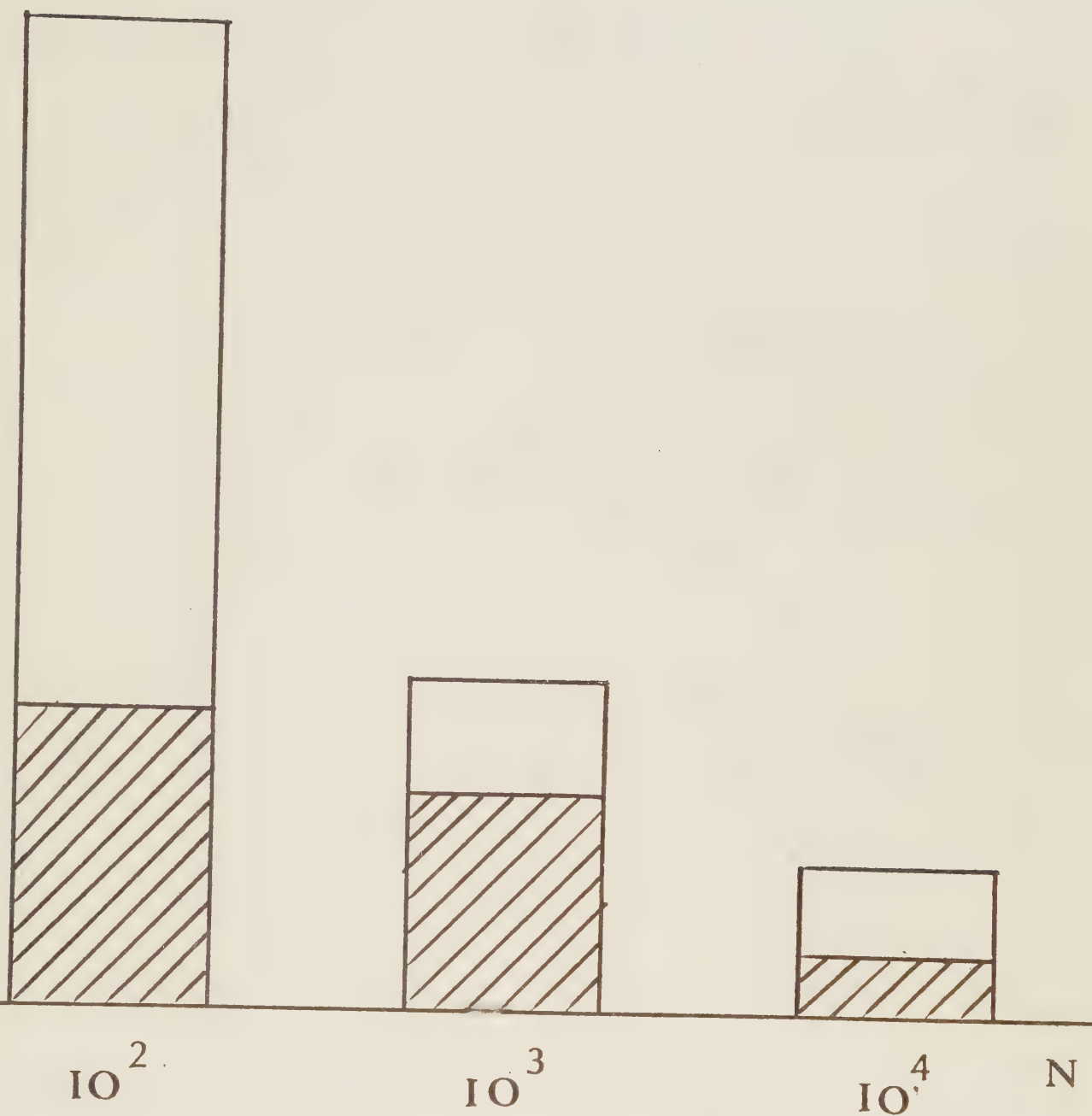


Figure 7 : Effet de la concentration en ion ammonium sur l'incorporation - 100, 1 000 ou 10 000 cellules prélevées en phase exponentielle (détermination turbidimétrique) - $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 0,01 et 1 mM

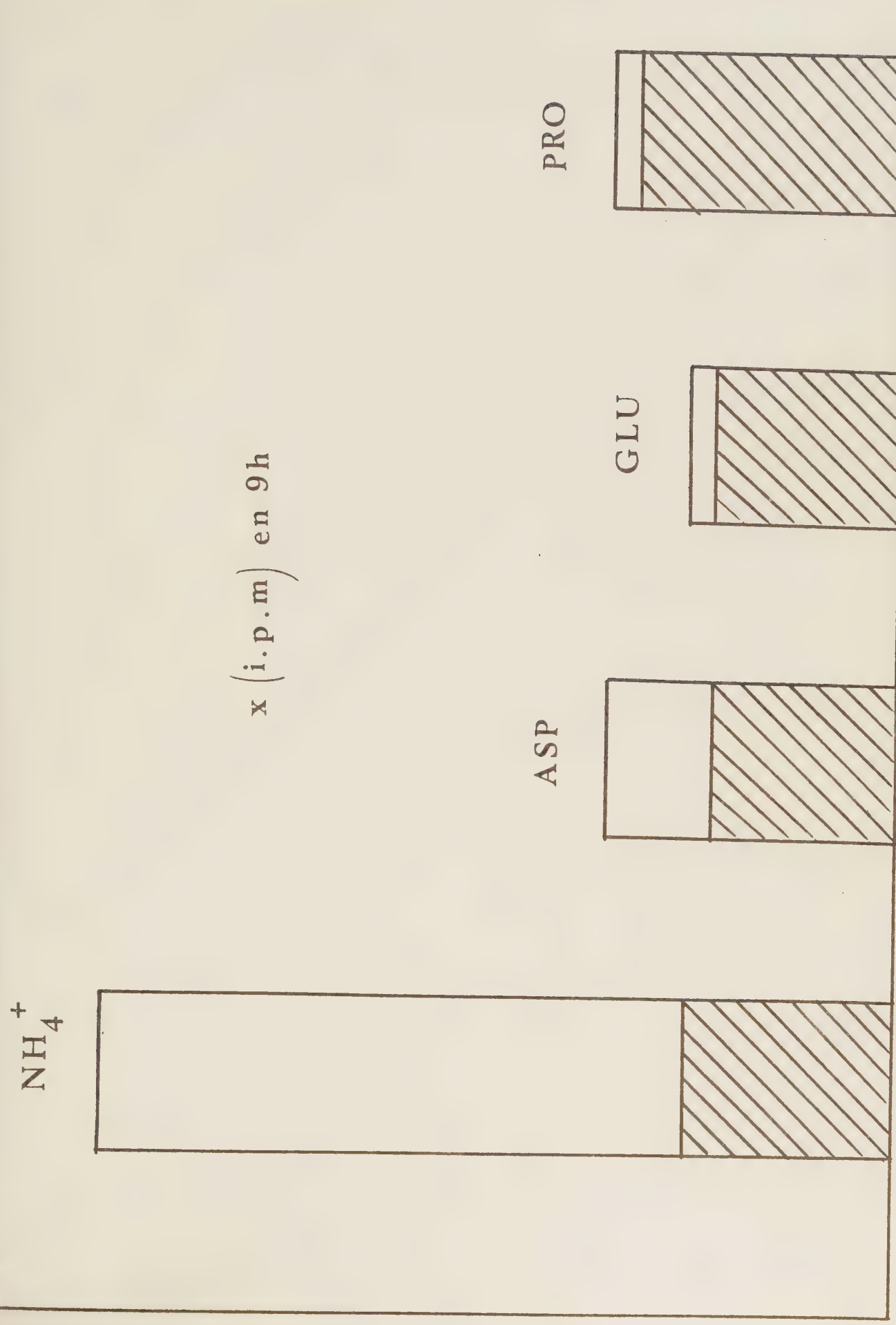


Figure 8 : Incorporation de ^{14}C -lysine en présence de différentes sources d'azote. : Zones non hachurées : levures récoltées en phase exponentielle (130 cellules) - : Zones hachurées : levures récoltées après une garde simulée (110 cellules). Sources d'azote testées : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 1 mM ; Acide aspartique, acide glutamique et proline 2 mM.

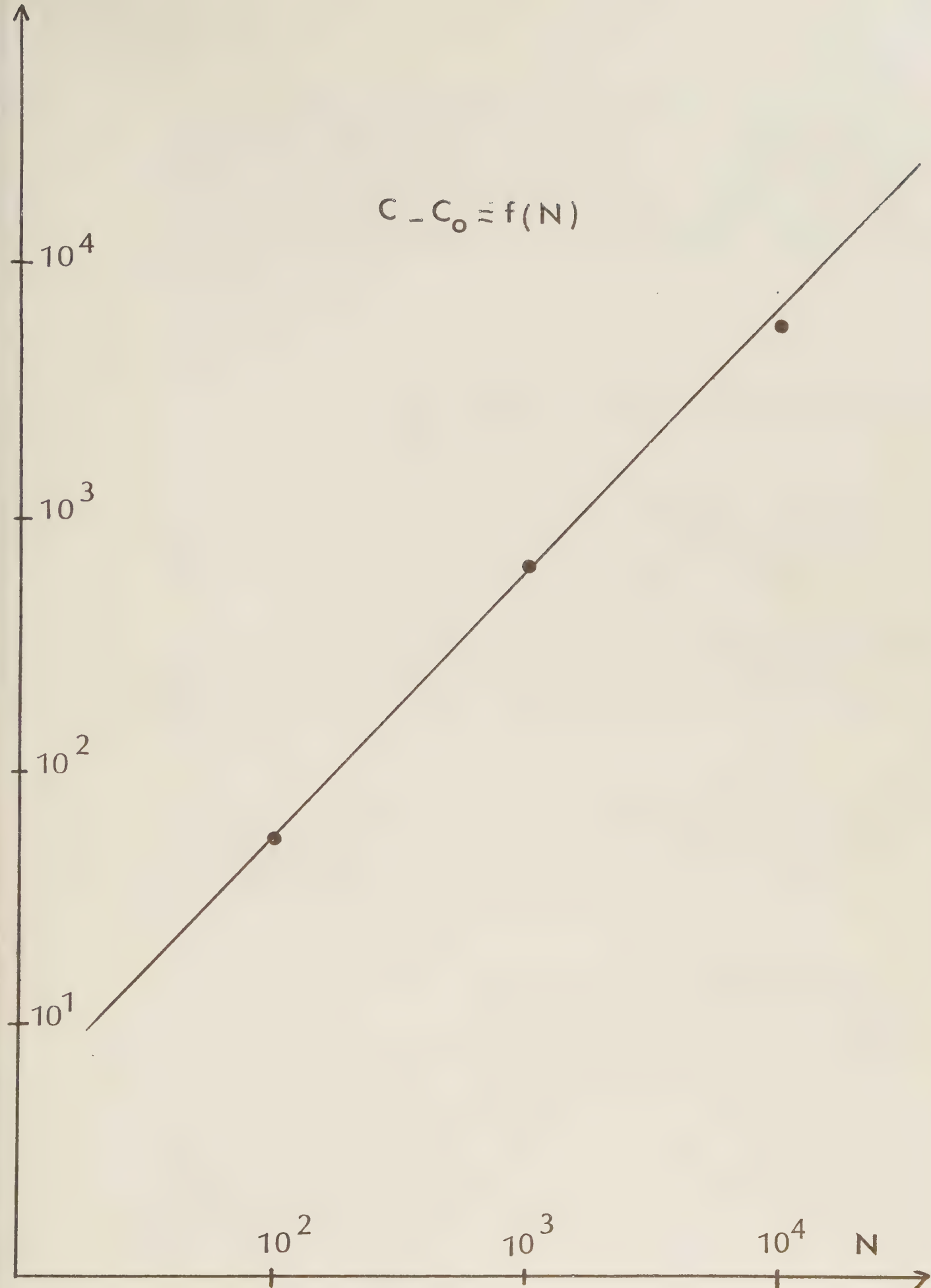


Figure 9 : Influence de la présence d'un entraîneur dans le milieu de culture (lysine $5\mu\text{M}$) sur la linéarité de la relation entre l'activité retenue et le nombre de cellules.

S'il en était de même dans le cas des cellules prélevées dans les conditions industrielles, il faudrait donc, pour obtenir la sensibilité maximum, se résigner à ce que la relation entre la radioactivité incorporée et le nombre de cellules ne soit pas linéaire. Une courbe d'étalonnage permettrait cependant d'établir une correspondance entre radioactivité et nombre de cellules.

3.1.2. - Essais réalisés avec des cellules prélevées en milieu ----- industriel

Les propriétés mises en évidence concernent la levure exponentielle : il s'agit maintenant d'obtenir des informations relatives au comportement de la levure récoltée en fin de garde ou à la filtration.

Etant donnée la lourde incidence des phénomènes de régulation sur la perméation, il est à prévoir que l'optimisation relative à la levure exponentielle n'est pas rigoureusement valable pour la levure de fin de garde.

En fait, il s'avère que la seule différence importante concerne l'effet de la source d'azote, la fig. (8) montre que la supériorité des ions ammonium sur les autres sources d'azote assimilable n'apparaît pas dans le cas des levures de fin de garde.

• 3.1.2.1. - Influence de l'état physiologique des cellules sur l'incorporation de ^{14}C -lysine

Une première expérience illustrée par la figure (10) montre comment l'aptitude de la levure à fixer la lysine évolue dans le temps en fonction de l'âge de la culture. A 28° C l'activité d'incorporation s'abaisse rapidement après la phase exponentielle. Au contraire, l'activité de la levure cultivée 24 h à 28° C mais conservée ensuite à 4° C afin de simuler les conditions de garde reste très stable au cours de la conservation.

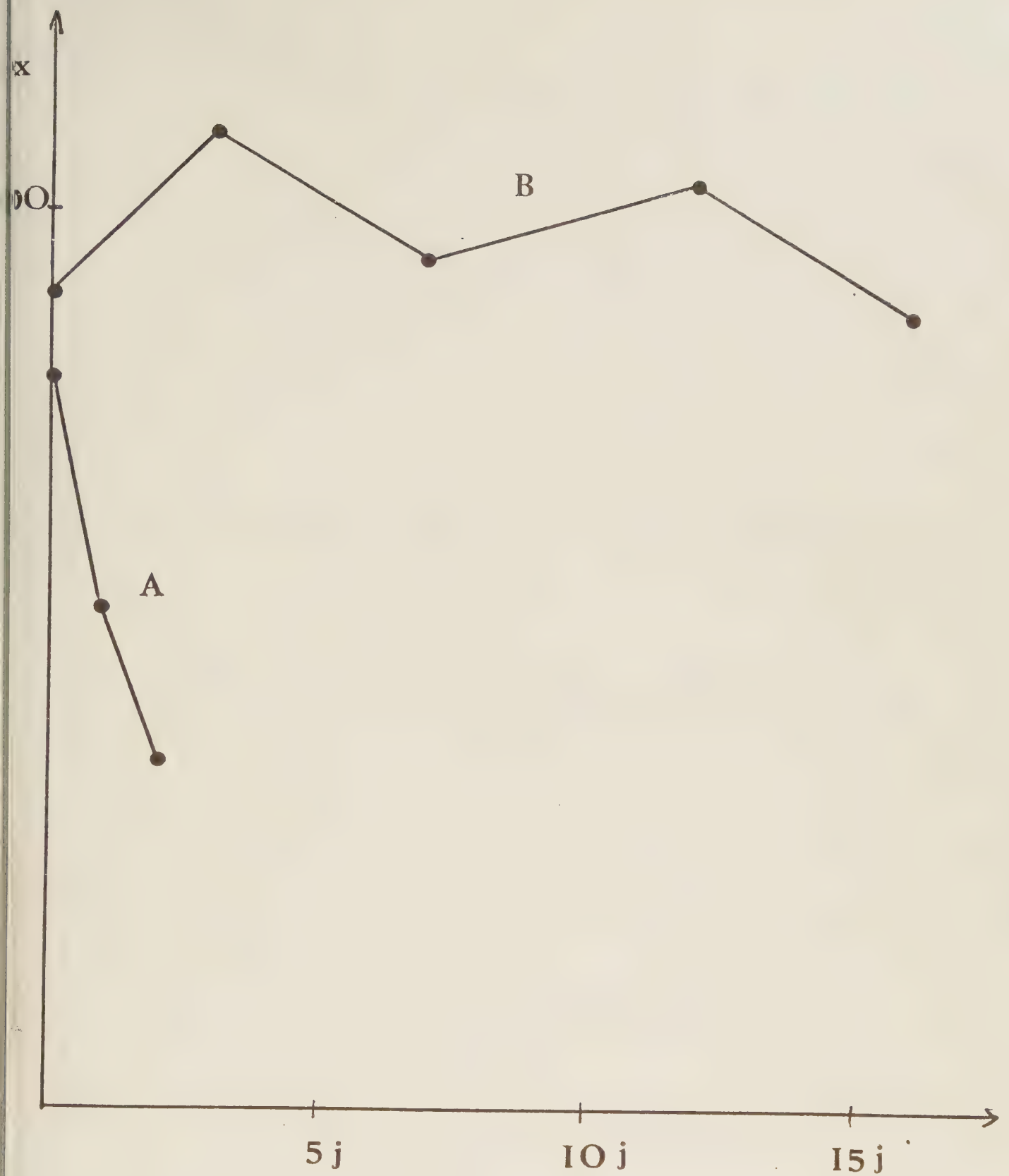


Figure 10 : Evolution de l'activité d'incorporation. 200 à 1 000 cellules (détermination par inclusion). Culture 24 h à 28° C sur moût puis séjour à 28° C (courbe A) ou à 4° C (courbe B).

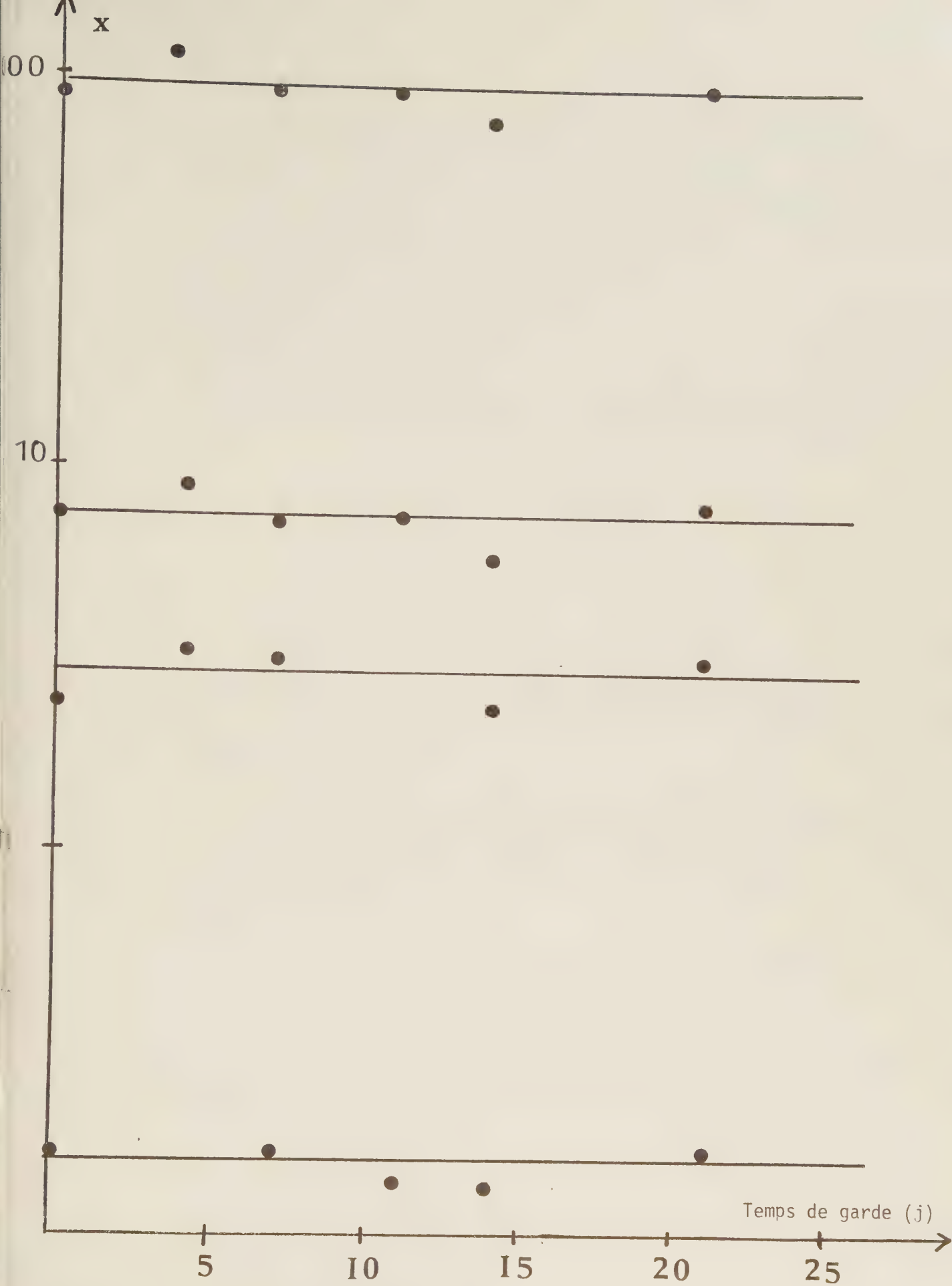


Figure 11 : Influence du temps de garde sur l'activité retenue par cellule.

Cette dernière expérience demandait une confirmation par l'étude du comportement des levures dans les conditions réelles de garde. Un échantillon de bière en cours de garde a donc été prélevé deux fois par semaine dans le même tank. Dans le but de déterminer l'activité retenue par cellule pour quatre temps d'incubation (1 h, 6 h, 9 h et 24 h) nous avons préparé des suspensions cellulaires à partir de chaque échantillon. Les résultats rapportés dans la figure 11 confirment que la valeur de l'activité retenue par les cellules reste remarquablement stable au cours de la garde. Les valeurs obtenues en moyenne pour l'activité retenue par cellule sont, en fonction du temps d'incubation, les suivantes :

pour t = 1 h	x = 0,15
t = 6 h	x = 2,92
t = 9 h	x = 7,52
t = 24 h	x = 98

Les points des courbes ont été déterminés avec des nombres de cellules compris entre 290 et 556 pour les temps d'incubation 6 h, 9 h et 24 h. Les nombres de cellules étaient compris entre 2 900 et 5 560 pour le temps d'incubation 1 h.

Il est évident que ce résultat est dans la pratique très favorable à la reproductivité des analyses et à une détection quantitative des cellules au niveau de la filtration et de la pasteurisation.

• 3.1.2.2. - Essai de reproductivité de l'activité retenue par les levures de fin de garde.

Une suspension dans du liquide de Ringer de 6 930 cellules/ml prélevées en fin de garde a été préparée afin de procéder à un essai de reproductivité de la méthode pour un temps d'incubation de 9 h.

Afin de pouvoir contrôler rigoureusement le temps d'incubation, les filtrations (1 ml de suspension) ont été espacées toutes les 4 minutes et les membranes retirées et rincées dans le même ordre 9 h après, également toutes les 4 minutes.

Les résultats obtenus à partir de 20 prélèvements sont reportés dans la table ci-dessous dans l'ordre chronologique où ils ont été effectués.

N = 6 930 ; t = 9 h

Prélèvement n°	c (c. p. m.)	Prélèvement n°	c (c. p. m.)
1	34 938	11	48 671
2	39 643	12	50 626
3	44 514	13	52 353
4	35 098	14	55 198
5	40 602	15	50 748
6	41 598	16	52 487
7	51 165	17	56 156
8	46 260	18	58 785
9	49 036	19	57 694
10	47 087	20	67 617

Ces résultats font apparaître une erreur systématique des mesures due aux variations des temps de séjour des cellules dans le liquide de Ringer. Les cellules étant restées plus longtemps en suspension dans le liquide de Ringer incorporent davantage de lysine, vraisemblablement en raison de leur starvation azotée prolongée.

La corrélation linéaire qui apparaît entre le temps de séjour des cellules dans le liquide de Ringer et la quantité de lysine incorporée est confirmée avec une très haute significativité par l'analyse de la droite de régression, ce qui permet de corriger l'erreur systématique signalée plus haut :

- Moyenne des mesures : $\bar{c} = 49\ 014$
- Coefficient de corrélation : $r = 91\ \%$
- Pente de la droite de régression : $a = 1\ 273$
- Ordonnée à l'origine : $a = 35\ 642$
- Variance résiduelle : $\sigma^2 = 11\ 008\ 452$
- Ecart type résiduel : $\sigma = 3\ 318$
- Coefficient de variation résiduel : C.V. = 6,77 %

La reproductivité de l'activité retenue par les cellules en fin de garde est donc des plus satisfaisantes, d'autant plus que la dispersion des mesures obtenues résulte des dispersions de trois paramètres : en effet $C = C_0 + NX$

Si la contribution de la dispersion des bruits de fond est faible dans les conditions de l'expérience, celle des valeurs de N l'est vraisemblablement moins.

• 3.1.2.4. - Relation entre l'activité retenue et le temps d'incubation.

Une cinétique d'incorporation de la lysine réalisée avec 734 cellules prélevées en fin de garde permet de connaître l'activité retenue par cellule x en fonction du temps d'incubation. La première partie de cette cinétique correspondant à $0 < t < 6$ h est représentée fig. 12. La totalité de la cinétique est représentée en unités semi-logarithmiques (fig. 13).

Cette dernière courbe, malgré sa complexité, fournit des renseignements intéressants sur l'importance relative des deux phénomènes, dont résulte l'activité mesurée, à savoir le transport actif de la lysine et la multiplication cellulaire.

Tout d'abord il paraît surprenant que la courbe (fig. 13) ne soit pas linéaire. En admettant en effet que l'équilibre d'incorporation de ^{14}C - lysine soit rapidement atteint, on s'attend à ce que l'activité retenue par cellule évolue en fonction du temps suivant la forme $x = A 2^{t/g}$

. A étant une constante dépendant du temps de latence relatif à la croissance et de l'activité retenue par chaque cellule individuelle.

. g étant le temps de génération de la souche

Ce qui se représenterait par une droite en unités semi-logarithmiques à partir du moment d'équilibre.

Or le graphe réellement obtenu est nettement curviligne et de pente décroissante. Cette distorsion de la courbe par rapport à une droite peut être interprétée de deux manières :

- le taux de croissance diminue au cours du temps par suite de l'existence d'un facteur limitant dans le milieu.

- l'incorporation de lysine radioactive est lente et se poursuit pendant une bonne partie du temps d'incubation, ce qui ne manquerait pas de modifier l'allure de la courbe. Si tel est le cas, il semble raisonnable de penser que, bien que la concentration en lysine soit nettement au-dessous du k_m de transport de lysine chez les levures, la vitesse d'entrée de la ^{14}C -lysine dans la cellule reste constant au cours du temps. En effet, même au bout de 24 h, 734 cellules ne retiennent qu'une activité de 72 000 i.p.m., ce qui représente environ 16 % de la quantité initiale de lysine présente dans le milieu. Si l'on admet d'autre part qu'après chaque division cellulaire, la cellule fille contient la même quantité de lysine marquée que la cellule mère, on peut écrire :

$$x = v t \cdot 2^{\frac{t - L}{g}} \quad (1)$$

v = vitesse d'incorporation de radioactivité (en i.p.m./t/heure

L = temps de latence relatif à la croissance cellulaire .

g = temps de génération

Suivant ce modèle, la pente de la courbe représentant l'évolution de l'activité retenue par cellule en fonction du temps décroît avec le temps. En effet,

$$\frac{d (\text{Log } x)}{dt} = \frac{1}{t} + \frac{\text{Log } 2}{g} ,$$

Il est clair que l'équation (1) ne peut être valide que dans un intervalle de temps suivant la phase de latence de la croissance cellulaire et précédant l'équilibre de l'incorporation de ^{14}C -lysine pour lequel $v = 0$.

Cette réserve étant émise, il est aisé de calculer le temps de génération g à partir de deux points quelconques de la courbe expérimentale. On a alors

$$g = \frac{(t_2 - t_1) \log 2}{\log \left(\frac{x_2}{x_1} \cdot \frac{t_1}{t_2} \right)} \quad (2)$$

La figure 14 représente l'évolution du temps de génération moyen en fonction du temps calculé à partir de l'équation (2) et des données de la courbe avec $t_2 - t_1 = 3$ h. La courbe permet de déterminer l'intervalle de temps pour lequel le modèle exprimé par l'équation (1) est justifié. Entre les temps d'incubation de 5 h et 12 h, le temps de génération calculé reste remarquablement constant, de l'ordre de 3,8 h, ce qui semble valider le modèle proposé dans cet intervalle de temps.

Au-delà de 12 h, le temps de génération calculé augmente brusquement, ce qui semble montrer que l'équation (1) n'est plus valide et que l'équilibre d'incorporation de ^{14}C -lysine est atteint ($v = 0$).

Dans ces conditions, la valeur de g n'obéit plus à l'équation (2) mais à l'expression :

$$g' = \frac{(t_2 - t_1) \log 2}{\log \frac{x_2}{x_1}} \quad (3)$$

Pour $t > 12$ h, les valeurs de temps de génération calculées selon l'équation (3) devraient être du même ordre que les valeurs calculées pour $t < 12$ h selon l'équation (2).

La fig. 14 montre que tel est bien le cas jusque 18 h. Au-delà, les valeurs de g augmentent rapidement.

L'équation (1) ne permet pas de calculer les valeurs de la vitesse d'incorporation de radioactivité v et le temps de latence L à partir des points de la courbe. Il existe en effet une infinité de couples (v, L) correspondant à la même valeur de x pour un temps d'incubation t . Toutefois, on peut évaluer l'ordre de grandeur de v en assimilant la portion de courbe de la fig. 12 comprise entre $t = 0$ et $t = 1$ h à une droite. On obtient ainsi une valeur de v égale à 0,24 i. p. m. / cellule / heure. Le temps de latence déterminé par le calcul serait alors de 1 h 30.

Les faits suggérés par le calcul sont-ils vraisemblables et en accord avec d'autres expériences.

Trois questions se posent en effet :

- Pourquoi l'établissement de l'équilibre d'incorporation de ^{14}C -lysine dans les cellules est-il si lent ? (12 h)

- La valeur du temps de génération ($g = 3,8$ h) calculée est-elle en accord avec une valeur déterminée de manière plus directe ?

- Pourquoi la croissance semble-t-elle ralentie après 18 h ?

La lenteur de l'incorporation de ^{14}C -lysine n'est pas surprenante dans la mesure où sa concentration dans le milieu est très basse ($1,5 \mu\text{M}$) et certainement très inférieure au K_m d'entrée de la lysine dans la cellule. (La valeur de ce K_m pour *S. cerevisiae* est, selon GRENSON, de $2,5 \times 10^{-5}$ M).

Par ailleurs, la croissance de la souche 1522 a été étudiée en milieu liquide par turbidimétrie afin de déterminer la valeur du temps de génération de cette souche. La valeur obtenue est de 3,2 h, valeur légèrement inférieure à celle que nous avons calculée plus haut, ce qui est logique dans la mesure où les conditions de croissance sur tampon absorbant imbibé de milieu de culture sont moins favorables que les conditions de croissance en milieu liquide sous agitation.

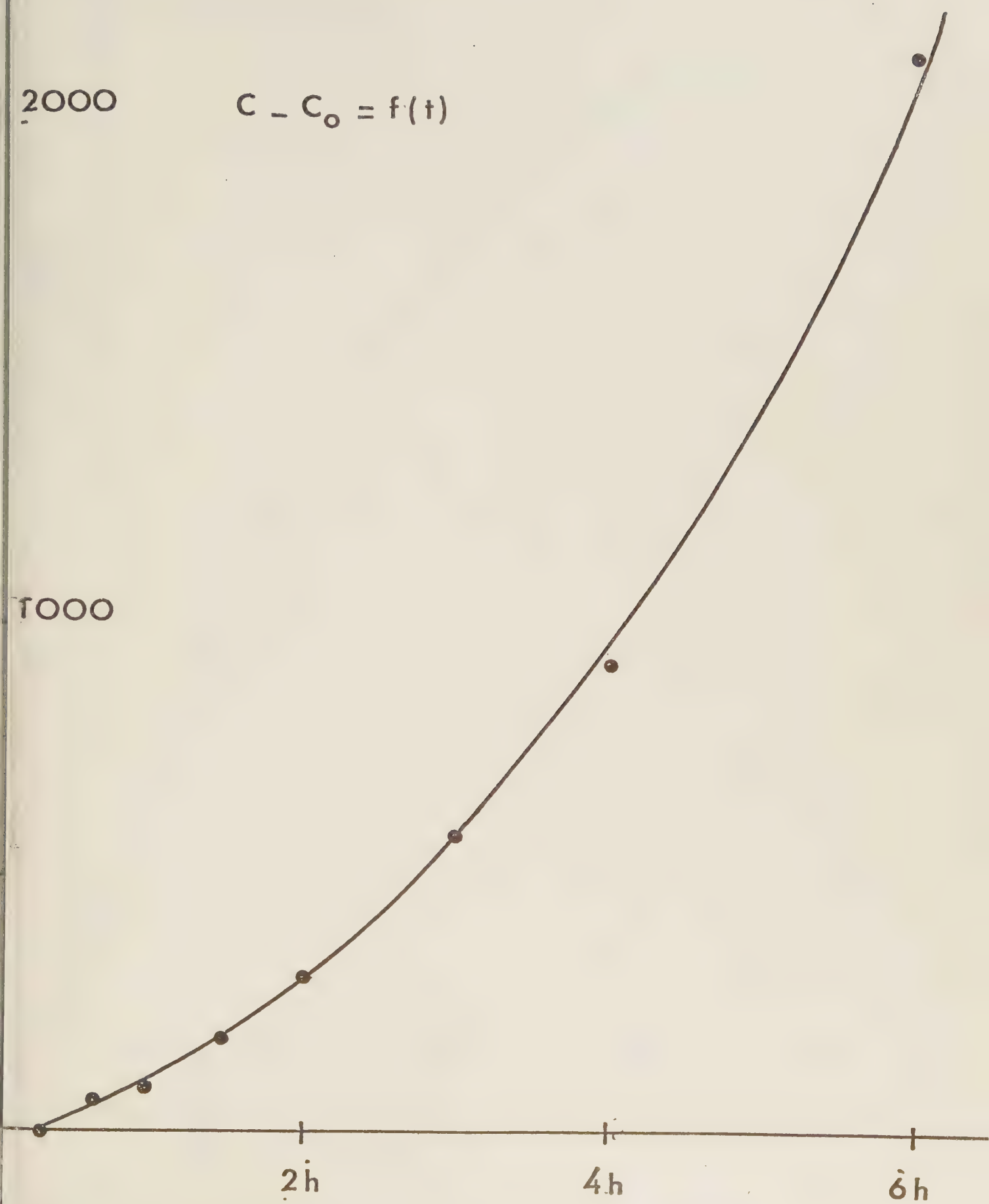


Figure 12 : Evolution de l'activité retenue par cellule en fonction du temps d'incubation (734 cellules prélevées en fin de garde).

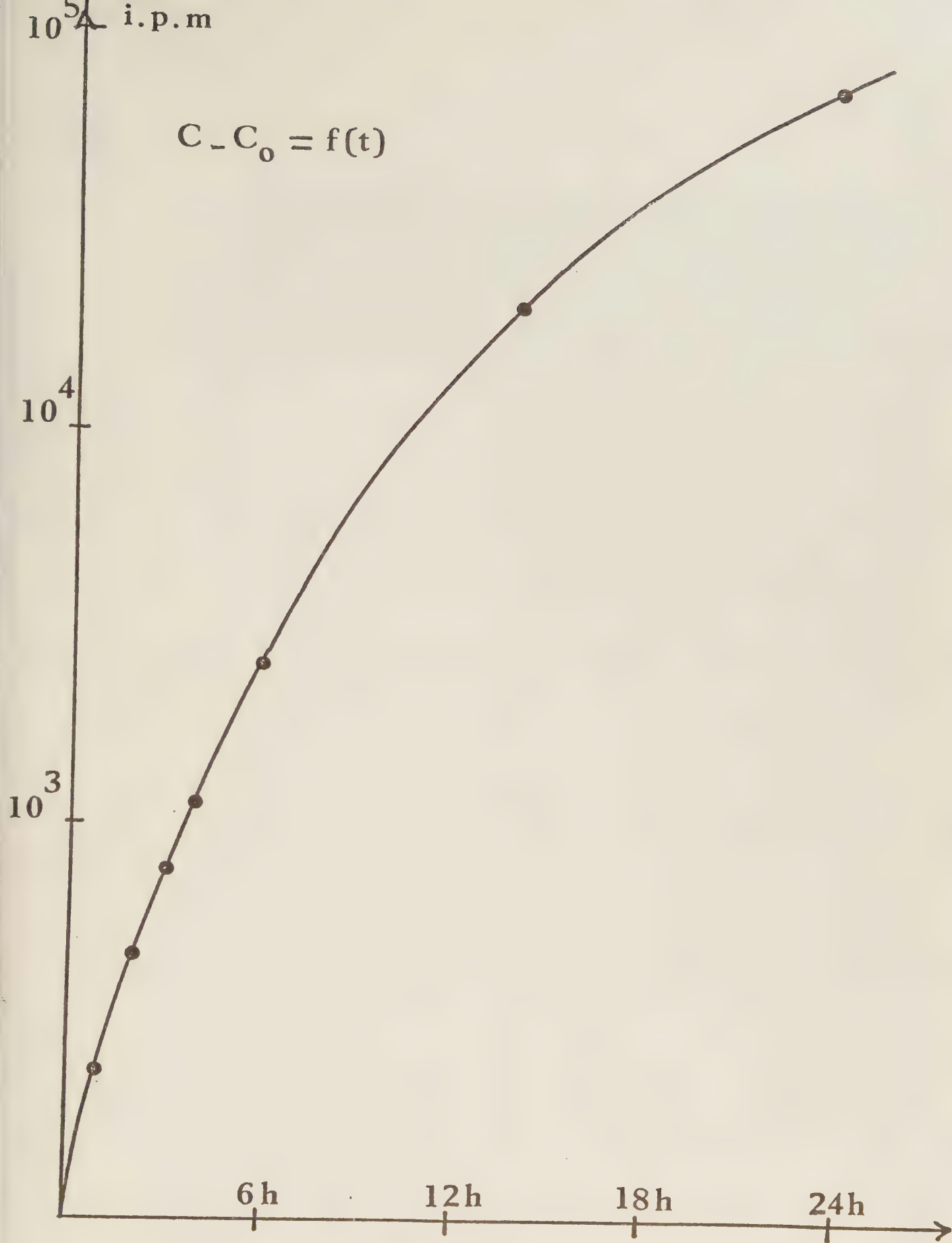


Figure 13 : Evolution de l'activité retenue par cellule en fonction du temps d'incubation. 734 cellules prélevées en fin de garde (unités semi-logarithmiques).

Equilibre de t_1 - lysine atteint

Equilibre de t_2 - lysine atteint

$$g = \frac{(t_2 - t_1) \log 2}{\log \frac{x_2 t_1}{x_1 t_2}}$$



$$g = \frac{\log \frac{x_2}{x_1}}{(t_2 - t_1) \log 2}$$



8h

6h

4h

2h

3h

6h

9h

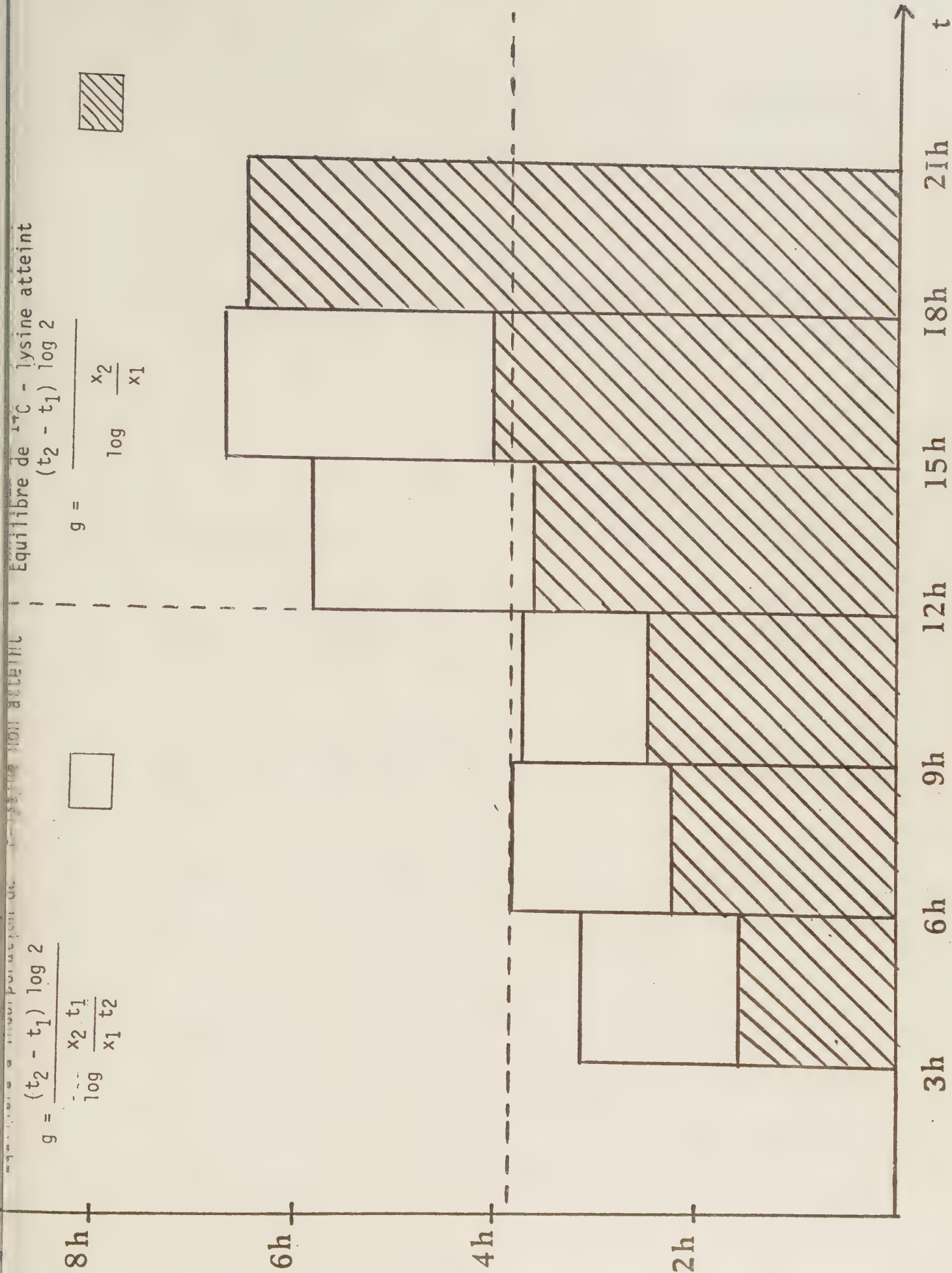
12h

15h

18h

21h

t



Le ralentissement de la croissance des cellules après 18 h d'incubation semble plus difficile à expliquer. Nous ne pensons pas que ce ralentissement soit dû à la présence d'un facteur limitant dans le milieu. Il a en effet été montré par ailleurs que, à la concentration de sulfate d'ammonium utilisée, il était possible de récolter plusieurs centaines de millions de cellules par ml. Il est vraisemblable que la croissance est ralentie par la dessiccation des tampons absorbants au bout de quelques heures d'incubation et que le milieu de culture migre de plus en plus difficilement à travers la membrane.

3.1.2.5. - Variations du seuil de détection en fonction du temps d'incubation.

Connaissant les variations de la fonction $x = f(t)$, il est possible d'en déduire approximativement les variations du seuil de détection $N^* = f(t)$.

Approximativement seulement car le seuil de détection est donné par $N^* = \frac{3,3 \sigma}{x}$

Or il n'y a aucune raison pour que l'écart type σ des bruits de fond reste constant avec le temps d'incubation. L'estimation de l'écart type n'a été déterminée que pour $t = 9$ h.

Pour les temps d'incubation inférieurs à 9 h, il est vraisemblable que σ est inférieur à l'écart type correspondant au temps d'incubation de 9 h. Les seuils de détections calculés en prenant comme base l'écart type pour 9 h auraient alors tendance à être surestimés.

Pour les temps d'incubation supérieurs à 9 h, il semble que l'écart type des bruits de fond n'évolue pratiquement pas. L'estimation de l'écart type des bruits de fond correspondant à $t = 48$ h, déterminée à partir de 30 mesures est $\tilde{\sigma} = 46,5$ (Rappelons que pour $t = 9$ h, $\hat{\sigma} = 55,5$). Dans ces conditions les valeurs des seuils de détection ne sont pas entachées d'erreur systématique due aux variations de σ .

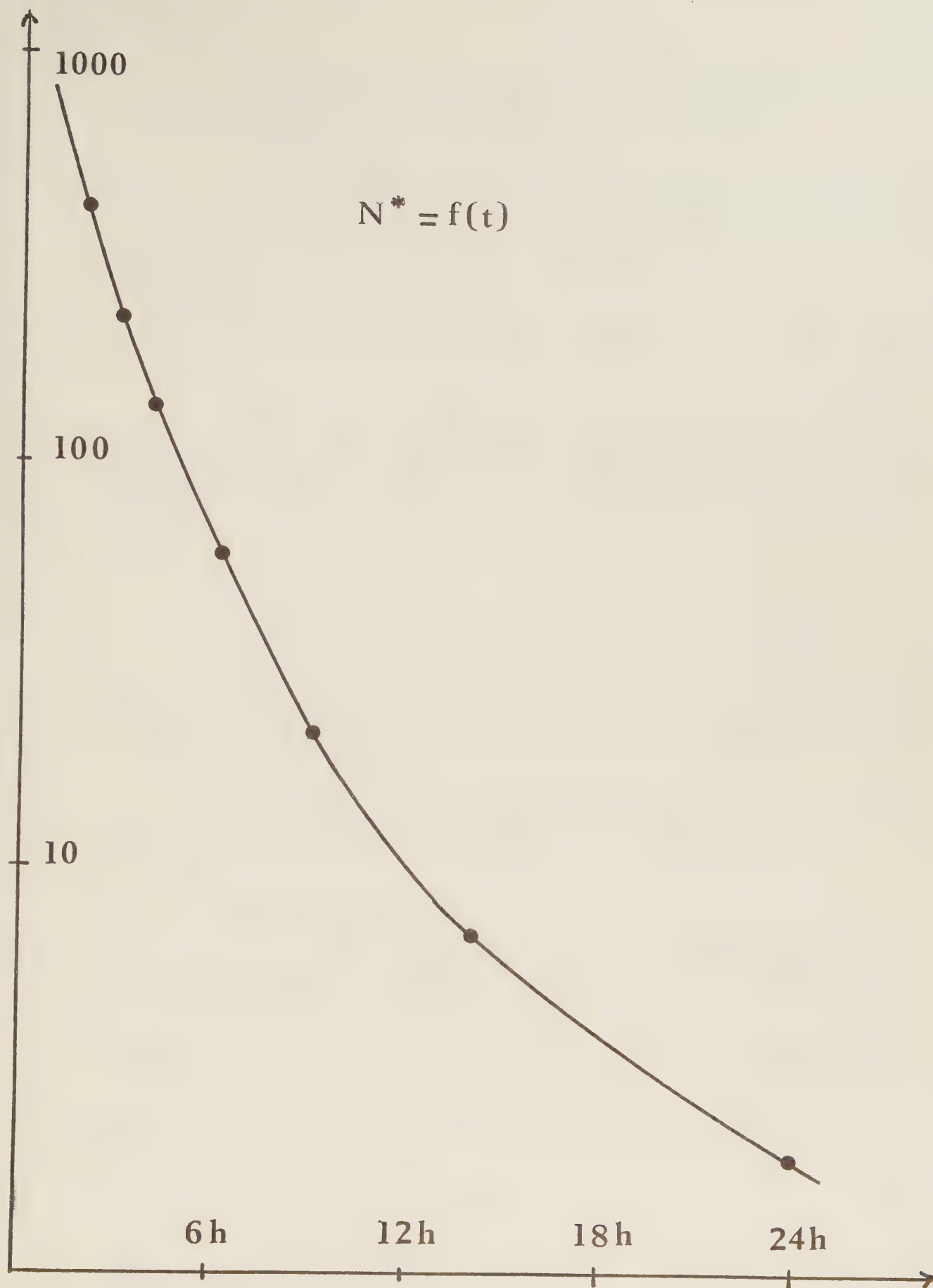


Figure 15 : Variations du seuil de détection en fonction du temps d'incubation (unités semi-logarithmiques).

Reportons ici quelques valeurs du seuil de détection N^* , les autres pouvant être lues sur la courbe $N^* = f(t)$ fig. 15.

t	1 h	2 h	3 h	4 h	6 h	9 h	14 h	16 h	20 h	24 h
N^*	1 400	436	228	145	58	23	7	5	3	2

Ces valeurs sont applicables lorsque le volume de rinçage de la membrane de filtration est de 200 ml. Lorsque le volume de rinçage est de 500 ml, les seuils de détection annoncés plus haut doivent être divisés par 1,75.

3.1.3. - Essais d'applications pratiques de la méthode en usine

Un essai échelonné sur plusieurs jours, avec la collaboration de la brasserie de Champigneulle, a été réalisé afin de contrôler le fonctionnement d'un pasteurisateur.

176 échantillons en bouteilles de 33 cl ont été prélevés en 30 fois à intervalles de temps réguliers.

Parmi ces 176 échantillons :

- . 89 ont été analysés par filtration et incubation sur milieu gélosé suivant la méthode classique.

- . 57 ont été analysés par notre méthode avec application d'un temps d'incubation de 9 h.

- . 30 ont été analysés par notre méthode avec un temps d'application de 24 h.

Cet essai avait pour but :

- de vérifier que notre méthode était applicable dans les conditions réelles de l'industrie,

- de vérifier que les informations établies en laboratoire n'étaient pas infirmées par les résultats d'un essai réalisé dans les conditions réelles d'analyse en usine.

Seule une analyse statistique permet d'interpréter les résultats obtenus.

En admettant qu'une infinité d'échantillons soient prélevés, la population théorique obtenue sera caractérisée par la distribution des catégories définies par le nombre de cellules présentes dans chaque échantillon.

Les 89 échantillons soumis à l'analyse classique permettent d'obtenir une image de cette distribution :

N (nombre de cellules)	0 à 2	3 à 7	8 à 12	13 à 17	18 à 23	> 23	Total
n_i (nombre d'échantil.)	25	22	7	6	5	24	89

(Rappelons que $N^* = 23$ est le seuil de détection de l'analyse radiométrique pour $t = 9$ h.)

Soit à déterminer le nombre K d'échantillons dont la contamination doit être théoriquement détectée par la méthode radiométrique avec $t = 9$ h.

K ne représente pas le nombre d'échantillons contenant plus de N^* cellules car les contaminations des échantillons contenant moins de 23 cellules ont une probabilité non négligeable d'être détectés.

Un calcul simple permet de déterminer cette probabilité pour les nombres de cellules correspondant à la borne inférieure de chaque catégorie. Soit p cette probabilité, on obtient les valeurs suivantes :

N	3	8	13	18
p	0,12	0,32	0,60	0,86

$$K = \sum n_i p_i = (22 \times 0,12) + (7 \times 0,32) + (6 \times 0,60) + 5 (0,86) + 24$$

$$K = 36,78$$

La proportion des échantillons devant théoriquement être signalés comme contaminés est

$$\pi = \frac{K}{\sum n_i} = \frac{36,78}{89} = 0,41$$

Sur les 57 échantillons soumis à l'analyse radiométrique ($t = 9$ h, $C^* = 339$), 19 font l'objet d'une détection de contamination.

Or le nombre théorique de détections est :

$$K_1 = 57 \times 0,41 = 23,4$$

Si l'on classe les échantillons suivant qu'ils font l'objet d'une détection de contamination ou non, on obtient les distributions suivantes :

	Nombre de détections	Nombre d'échantillons ne faisant pas l'objet d'une détection de contamination
Distribution réelle	19	38
Distribution théorique	23,4	33,6

Le test de χ^2 assorti de la correction de Yates (valable pour un classement en 2 catégories et un nombre d'échantillons inférieur à 500) permet de déterminer si la distribution réelle est compatible avec la distribution théorique, donc si les bases de notre méthode de détection sont valides

$$\chi^2 = \frac{(|123,4 - 19| - \frac{1}{2})^2}{23,4} + \frac{(|133,6 - 38| - \frac{1}{2})^2}{33,6} = 1,10$$

Or le seuil de significativité du χ^2 , associé à un degré de liberté $\nu = 1$ est $\chi^2 = 3,84$.

Il n'y a donc pas de différence significative entre les deux distributions et les bases de notre méthode de détection ne sont pas mises en cause.

Le même test doit être appliqué à la méthode radiométrique pour $t = 24$ h.

L'activité critique associée à ce temps d'incubation est $C^* = 440$, le seuil de détection $N^* = 2$.

Un classement approprié des 89 échantillons soumis à l'analyse classique comportera les catégories suivantes :

N (nombre de cellules):	0	1	> 1	TOTAL
n_i (nombre d'échantillons)	19	1	69	89

Sur les 89 échantillons, le nombre K_2 théorique de détections réalisées par la méthode radiométrique avec $t = 24$ h est donc $K_2 = 69$, ce qui correspond à une proportion :

$$\pi = \frac{69}{89} = 0,77$$

Parmi les 30 échantillons soumis à la méthode radiométrique pour $t = 24$ h, le nombre théorique de détection est donc $30 \times 0,77$, soit 23,1.

Or le nombre réel de détections est 19.

Classant les échantillons suivant leur état de contamination ou non, on obtient les distributions suivantes :

	Nombre de détections	Nombre d'échantillons ne faisant pas l'objet d'une détection de contamination
Distribution réelle	19	11
Distrib. théorique	23,1	6,9

$$\chi^2 = \frac{((23,1 - 19) - \frac{1}{2})^2}{23,1} + \frac{((16,9 - 11) - \frac{1}{2})^2}{6,9} = 2,44$$

Le χ^2 obtenu reste inférieur au seuil de significativité (3,84). La différence entre les deux distributions n'est donc pas significative et les bases de notre méthode de détection ne sont pas mises en cause.

3.2. - Généralisation de la méthode

Après la mise au point de la méthode radiométrique appliquée à la détection des levures de culture, il restait à étudier dans quelle mesure les autres micro-organismes de contamination pouvaient être détectés par cette méthode et, éventuellement, à modifier les conditions de culture afin de faciliter la détection de ces derniers.

3.2.1. - Cas des levures sauvages

L'aptitude des différentes levures à être détectées par la méthode radiométrique a été appréciée en fonction des deux caractères propres à chaque souche et intéressant l'intensité du signal radioactif émis par les cellules, à savoir :

- la vitesse d'incorporation de lysine marquée par cellule
- le temps de génération de la souche

Les cellules étaient précultivées en milieu synthétique, prélevées en phase exponentielle puis remises en suspension sur le milieu de culture à la ^{14}C - lysine dans des "fioles de croissance". L'incubation ayant lieu en régime d'agitation, des prélèvements de 1 ml de culture étaient effectués à intervalles de temps réguliers pendant 2 heures. La membrane était rincée par 50 ml de solution de rinçage, puis séchée avant d'être introduite dans le flacon de comptage.

Parmi les souches de levure dont la présence est réputée fréquente dans les brasseries, nous avons étudié d'une part les souches de collection, d'autre part des souches isolées de diverses brasseries identifiées.

Souches de collection étudiées

S. diastaticus
S. pastorianus
S. chevalierii
Candida lipolytica
C. tropicalis
Hansenula anomala

Souches isolées et identifiées

Hansenula anomala
H. subpelliculosa
Candida sake

Souches témoin de levures de culture

Kronenbourg 2285
S. E. B. 1522

Les figures 16 et 17 montrent l'évolution de l'activité retenue par cellule en fonction du temps pour chaque souche étudiée. Dans cette étude particulière, on entend par activité retenue par cellule, l'activité mesurée, rapportée au nombre de cellules réellement présentes au temps t et non pas au nombre de cellules initial.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous où v représente la vitesse d'incorporation de lysine marquée exprimée en i. p. m./cellule/heure et g le temps de génération.

	v	g
S. Carbsbergensis 1522	2,5	3,2 h
S. Carbsbergensis 2281	0,77	5 h
S. diastaticus	0,63	2,1 h
S. pastorianus	1,48	5 h
S. Italicus	3,0	2,6 h
S. Chevalieri	1,56	4,7 h
H. anomala	0,41	1,8 h
H. subpelliculosa	0,36	5,4 h
C. lipolytica	0,38	1,6 h
C. tropicalis	0,19	0,9 h
C. sake*	0,17	

* Syn. : C. tropicalis, variété lambica.

Ainsi, toutes les souches étudiées incorporent elles la lysine à une vitesse qui, bien que variable, reste du même ordre de grandeur que celle des levures de culture, ce qui permet de penser que ces souches sont détectables par la méthode radiométrique.

On constate que la majorité des levures sauvages, en particulier les Candida, poussent plus rapidement que les levures de culture mais incorporent la lysine parfois plus lentement.

On peut donc s'attendre à ce que la détection des levures du genre Saccharomyces soit plus facile que celle des autres levures pour les temps d'incubation courts. Au contraire, pour les temps d'incubation plus longs, les levures du genre Candida ou Hansenula devraient prendre l'avantage et retenir nettement plus de radioactivité que les levures de culture.

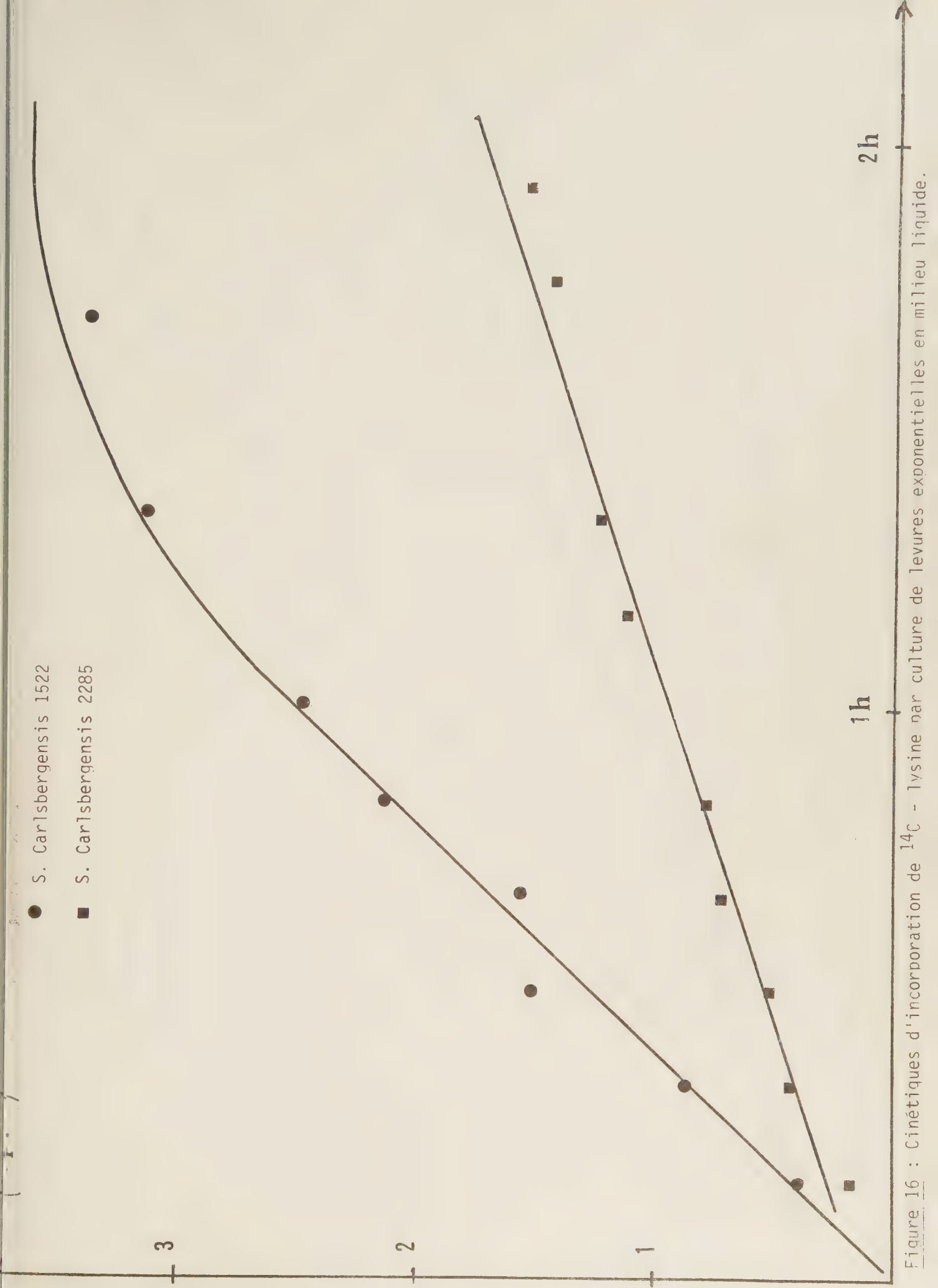


Figure 16 : Cinétiques d'incorporation de ^{14}C - lysine par culture de levures exponentielles en milieu liquide.

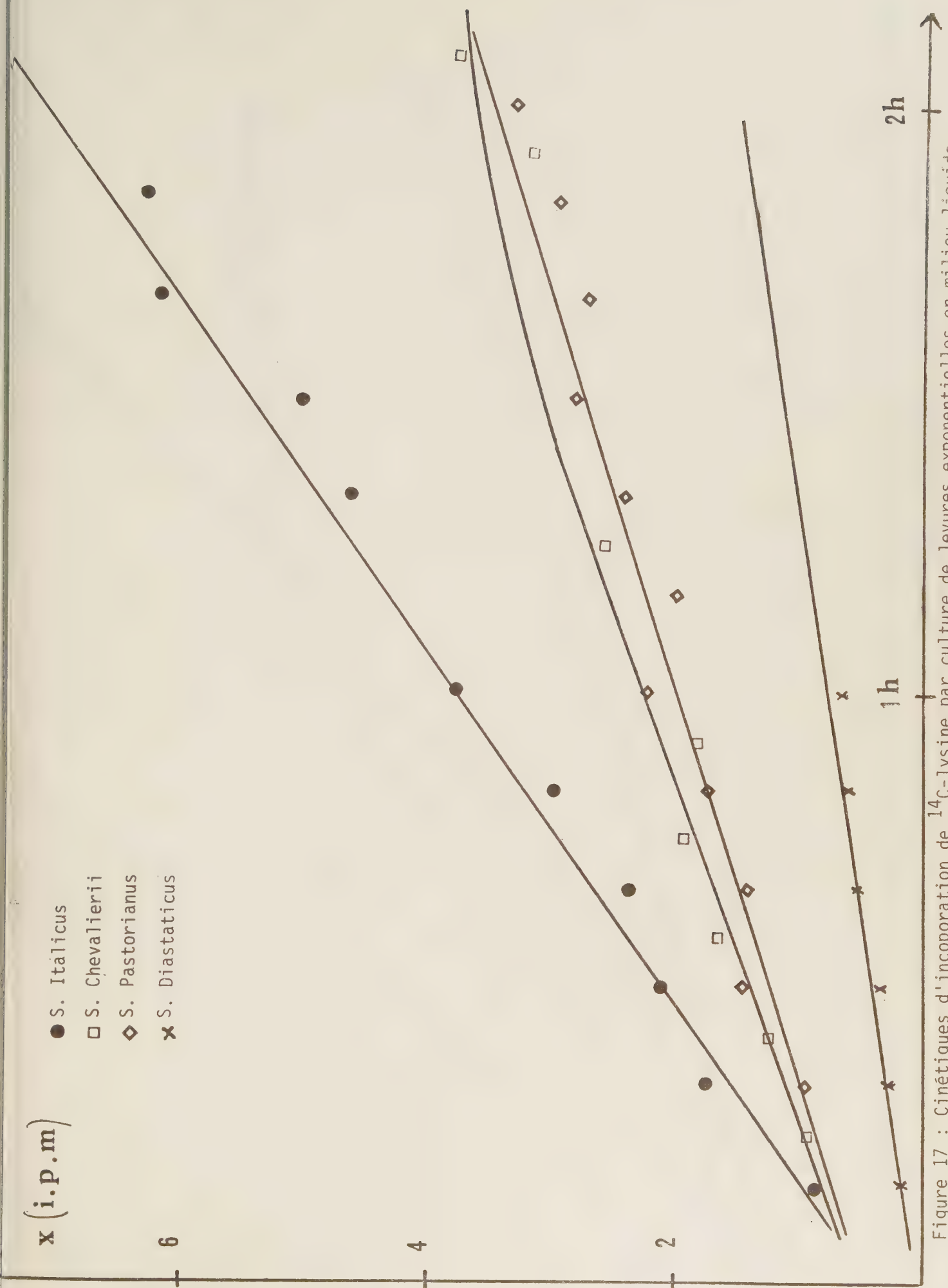


Figure 17 : Cinétiques d'incorporation de ^{14}C -lysine par culture de levures exponentielles en milieu liquide.

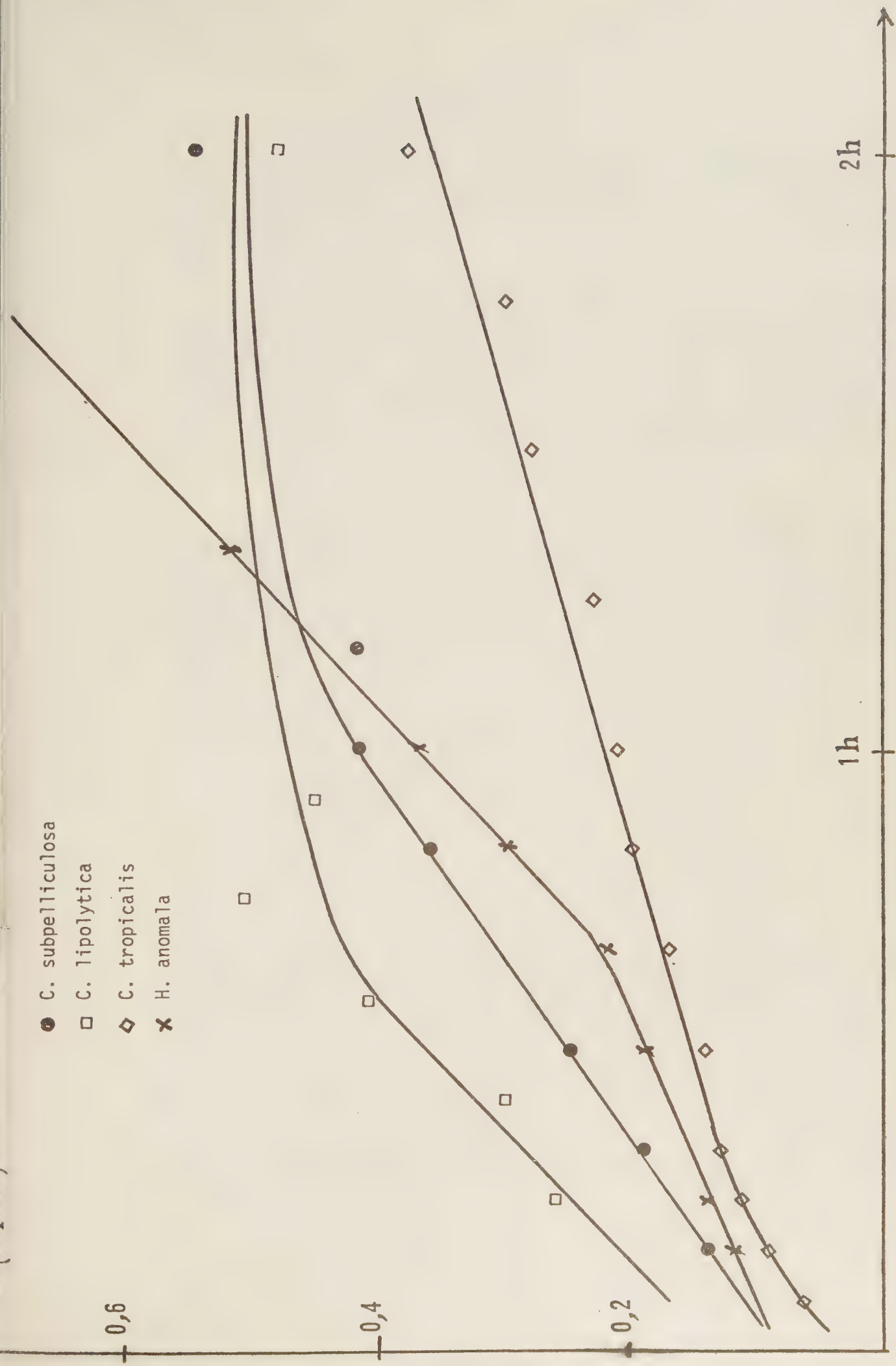


Figure 18 : Cinétiques d'incorporation de ^{14}C -lysine par culture de levures exponentielles en milieu liquide.

3.2.2. - Cas des bactéries

Nous avons choisi de nous attaquer à la détection des bactéries lactiques qui sont à la fois les bactéries les plus redoutées en brasserie et les plus longues à détecter par les méthodes classiques (incubation de 5 à 7 jours).

Un certain nombre d'essais négatifs ont montré que le milieu de culture à utiliser pour la détection des lactobacilles devait être radicalement différent de celui utilisé pour la détection des levures, c'est pourquoi nous avons cherché à adapter le milieu classique VLB-L-41, réputé actuellement le plus efficace pour la détection des lactobacilles, à notre technique.

Le milieu VLB - L 41 liquide se prépare de la façon suivante : on fermente un moût de bière à 10° Plato à la limite à 25° C avec une levure basse. La levure est éliminée par filtration et le filtrat est soumis à une ébullition prolongée de façon à réduire son volume de 50 %. A 500 ml de bière bouillie, on ajoute 200 ml d'eau distillée et on filtre. On ajoute alors :

- Yeast Extract (DIFCO)..... 10 g
- Amino acides (DIFCO) 10 g
- Liver Extract (DIFCO) 20 ml
- Maltose 5 g
- Xylose 2,5 g
- Fructose 2,5 g

Le pH est amené à 5,0 - 5,2 et le volume est complété à 1000 ml. Après stérilisation, on ajoute de l'alcool β - phényléthylrique à la concentration de 0,4 % et de l'actidione à la concentration de 20 p. p. m.

L'adaptation de ce milieu à notre technique radiométrique nécessitait les modifications suivantes :

- Addition dans le milieu de lysine radioactive (activité de 0,2 μCi /ml de milieu)

- Suppression de l'entraîneur introduit par les extraits azotés entrant dans la composition du milieu.

- Modification du pH de façon à favoriser la croissance cellulaire sans toutefois compromettre la sélectivité du milieu.

- a) - Elimination de la lysine libre des extraits azotés entrant dans la composition du milieu de culture.

Le milieu VLB - L - 41 étant très riche en extraits azotés, il a été nécessaire d'envisager l'élimination de la lysine libre contenue dans ces extraits de manière à supprimer l'effet négatif de la dilution isotopique de la lysine marquée introduite dans le milieu.

Compte tenu des concentrations d'extraits utilisés, on peut évaluer la concentration de lysine libre ainsi introduite dans le milieu : elle est de l'ordre de 10 mM alors que la concentration de lysine marquée dans le milieu est de l'ordre du μ M. C'est dire que la séparation devra être extrêmement fine.

Nous avons pu résoudre ce problème par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions en utilisant la méthode proposée par NAIR, J.H(1953) pour la séparation des acides aminés basiques.

La résine utilisée est l'Amberlite IRC - 50 avec un tampon d'élution à pH 5 à l'acide acétique/acétate de sodium 0,1 M. Nous avons utilisé des colonnes de 25 mm de diamètre et 30 cm de hauteur.

Le contrôle quantitatif de la séparation obtenue n'est pas possible par chromatographie sur couche mince lorsqu'il s'agit de détecter des traces de lysine, c'est pourquoi nous avons préféré une autre technique qui consiste à marquer la solution azotée dont on veut séparer la lysine par de la ^{14}C - lysine. L'activité de la solution est mesurée avant et après son passage dans la colonne échangeuse d'ions, ce qui permet de contrôler la séparation. La mesure de l'activité de la solution s'effectue en prélevant 0,2 ml de solution que l'on mélange à 10 ml de liquide scintillant et 3,8 ml d'éthanol pur dans un flacon de comptage.

Par cette technique, nous avons constaté que le rendement de la séparation de la lysine de la solution d'extrait azoté variait entre 97 et 98 %, c'est à dire que 2 à 3 % de la lysine échappait à l'adsorption des

résines. Le passage de la solution azotée sur colonne avait donc pour effet de réduire la dilution isotopique de la ^{14}C - lysine du milieu de culture de 10^4 à environ 250 ce qui constituait un progrès sensible mais très insuffisant.

Il a donc été nécessaire d'effectuer trois passages successifs de la solution sur colonne échangeuse d'ions pour obtenir une séparation suffisamment poussée pour nos besoins. Nous avons vérifié que les rendements des deuxième et troisième passages sur colonne étaient du même ordre que le rendement du premier passage. Dans ces conditions, le taux de lysine ayant échappé à l'adsorption des résines après trois passages n'est plus que de l'ordre de 0,0015 %, ce qui est très satisfaisant.

La technique de séparation utilisée ne retient pas seulement la lysine mais aussi les acides aminés plus basiques que la lysine, notamment l'arginine et l'histidine, c'est pourquoi nous restituons au milieu de culture, après chromatographie de la solution d'extraits azotés, de l'arginine (10 mg/l) et de l'histidine (10 mg/l). Il faut noter d'autre part que le tampon d'élution introduit dans le milieu de culture de l'acétate à concentration de 0,05 M.

b) - Optimalisation du pH du milieu de culture

Le pH du milieu VLB - L 41 est habituellement ajusté à 5,0 - 5,2 de manière à lui donner un caractère sélectif.

Un essai réalisé sur une souche de *Lactobacilles Casei* montre que le rendement du milieu est nettement supérieur à un pH plus élevé (fig.19). Nous nous sommes toutefois limité à pH 6 dans le choix du pH du milieu afin de ne pas enlever à celui-ci tout caractère sélectif.

c) - Optimalisation de la température d'incubation

Un essai réalisé avec des cellules de *Lactobacilles Casei* montre que la température d'incubation la plus favorable est 30° C. (fig. 20)

• 3.2.2.3. - Performances obtenues après optimisation du milieu de culture

Faute d'avoir pu obtenir des lactobacilles fraîchement prélevés dans des brasseries, nous avons dû évaluer l'activité retenue par cellule pour un temps d'incubation donné sur des cellules de L. Casei cultivé au laboratoire.

Les cinétiques d'incorporation de ^{14}C - lysine reportées dans la figure 21 concernant des cellules de Lactobacilles Casei issues respectivement d'une préculture en phase exponentielle en milieu VLB - L 41 et d'une préculture conservée pendant 5 jours à 4° C après la croissance exponentielle. Cette expérience confirme que, dans le cas où les cellules sont prélevées d'une préculture vieille l'activité retenue par cellule au bout de 24 h est d'environ 0,05 i. p. m., ce qui correspond à un seuil de détection de 3 600 cellules. Ce résultat est en accord avec les essais concernant l'optimisation du pH et de la température d'incubation reportés plus haut.

Bien que cette performance constitue un progrès très net par rapport à celles obtenues par les méthodes classiques de détection et bien qu'elle soit, à notre connaissance, inégalée par d'autres techniques, elle semble insuffisante pour une application généralisée en brasserie. Il est vrai que la prolongation des temps d'incubation jusqu'à 2 ou 3 jours devrait permettre d'abaisser sensiblement le seuil de détection. Les concentrations cellulaires critiques de contaminants rencontrés en brasserie sont en effet très faibles. Nous pensons néanmoins que l'utilisation de notre méthode radiométrique pour la détection ou le dénombrement approximatif des lactobacilles peut être intéressante dans le cadre d'autres industries alimentaires dans lesquelles les concentrations bactériennes sont plus importantes.

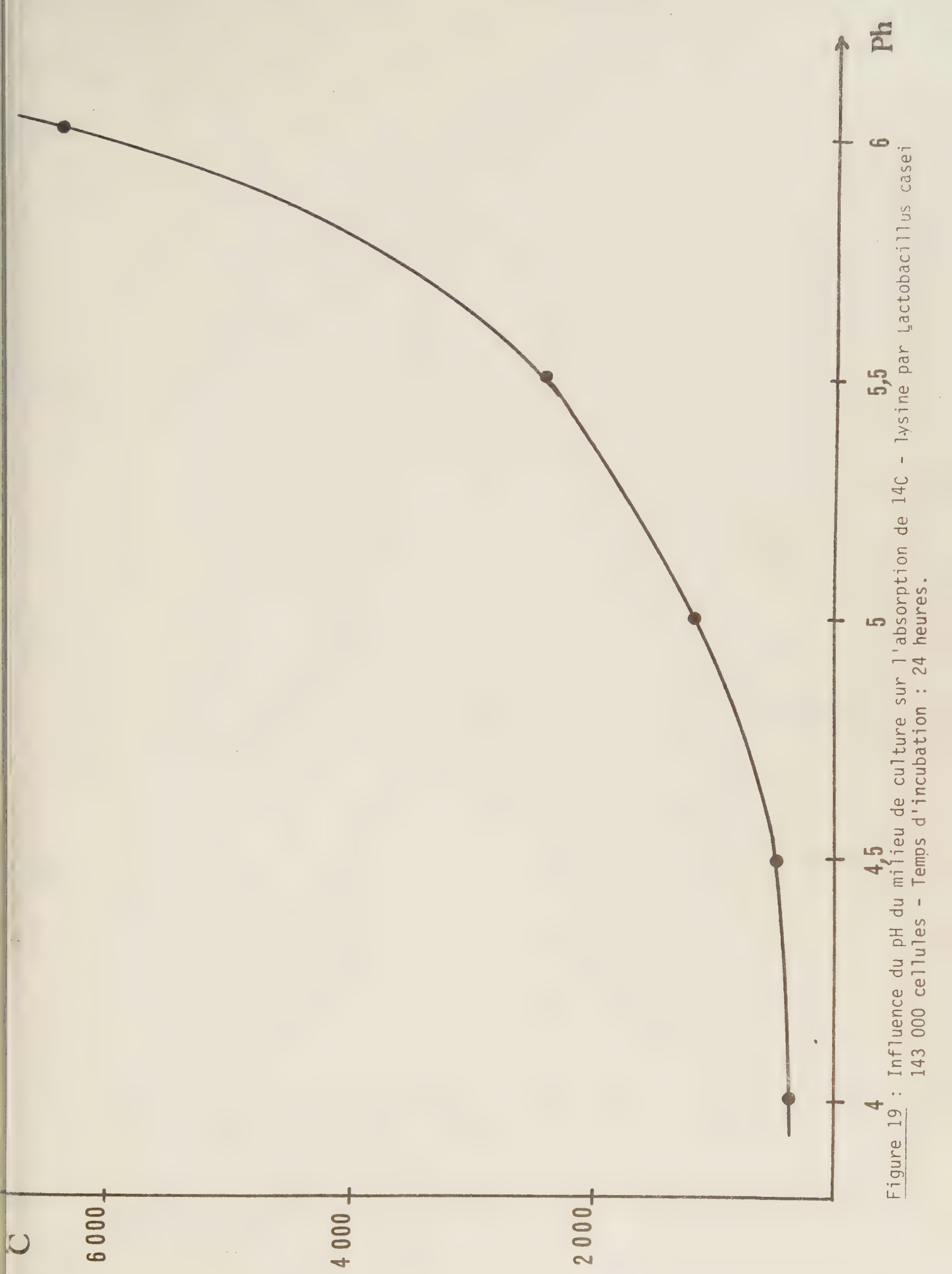


Figure 19 : Influence du pH du milieu de culture sur l'absorption de ^{14}C - lysine par *Lactobacillus casei* 143 000 cellules - Temps d'incubation : 24 heures.

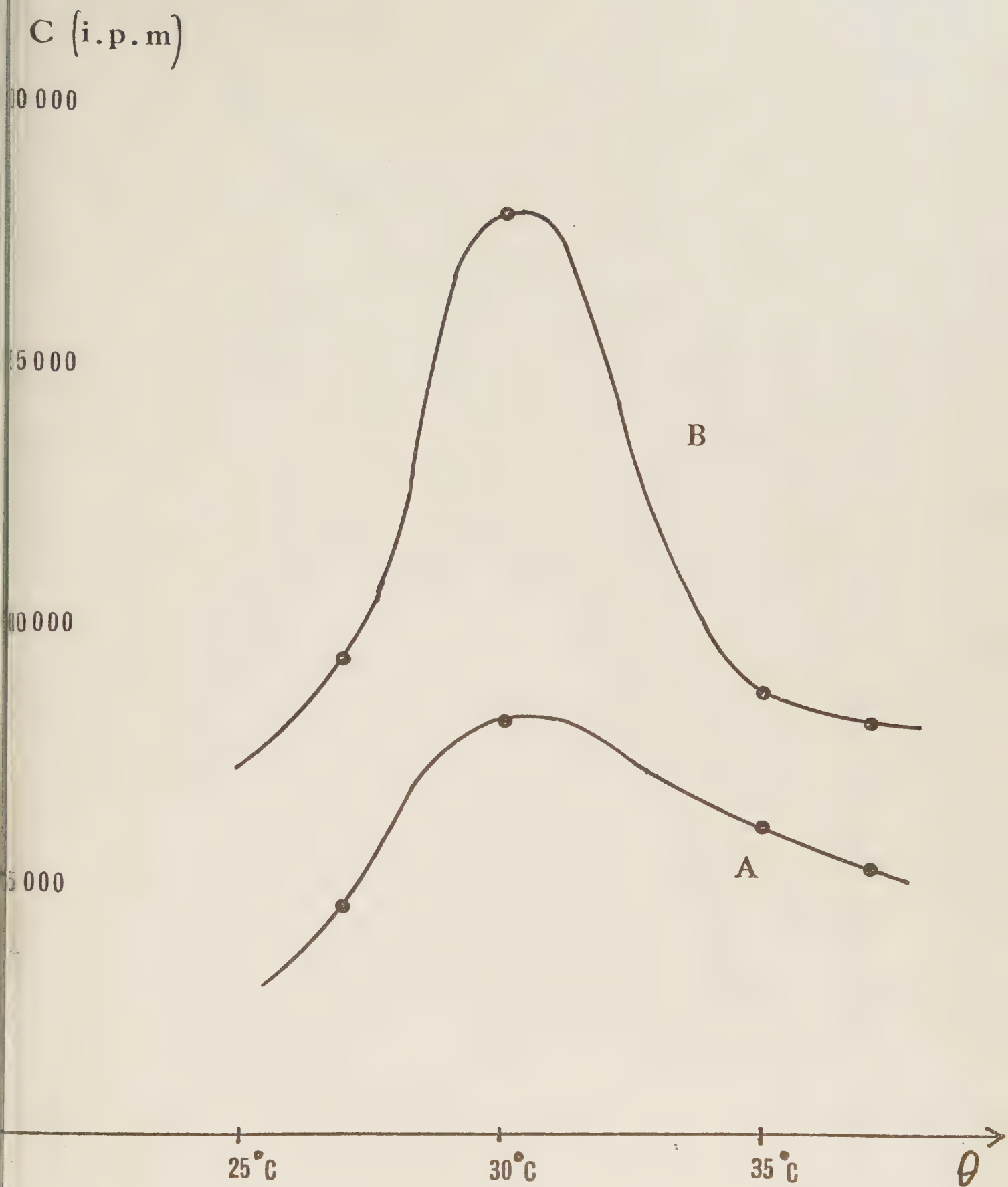


Figure 20 : Influence de la température d'incubation sur l'absorption de ^{14}C - lysine par *Lactobacillus casei* pour un temps d'incubation de 24 heures (courbe A) et de 48 heures (courbe B).

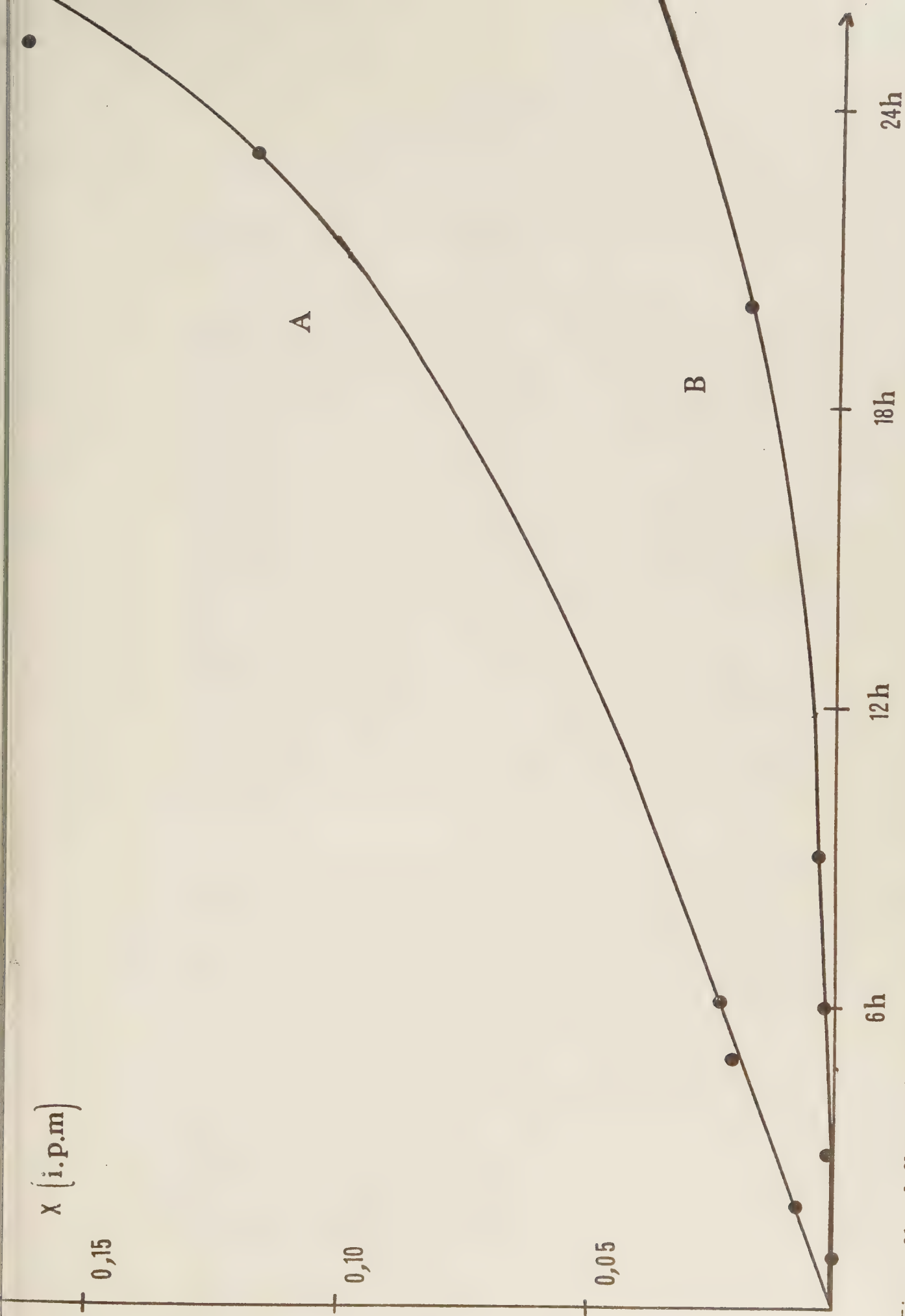


Figure 21 : Influence de l'état physiologique des cellules de *Lactobacillus casei* sur la vitesse d'incorporation de ^{14}C -lysine
 6 800 cellules prélevées en phase exponentielle (courbe A) - 150 000 cellules conservées 5 jours à 4°C après la
 croissance exponentielle (courbe B).

/ CONCLUSION /

Qu'est ce qui finalement caractérise notre méthode et quelles sont ses possibilités d'application ?

Sa première originalité est, en dehors de la technique utilisée, sa sensibilité extrême qui laisse espérer soit une détection rapide, soit un seuil de détection très bas, sa souplesse permettant de combiner de façon variée ces deux avantages. Elle permet de détecter 1 400 cellules de levure de culture en 1 h, 140 cellules en 4 h, 23 cellules en 9 h et 2 cellules en 24 h avec une sécurité de 95 %, ce qui la rend apte au contrôle de la pasteurisation ou de la filtration après la garde. La méthode permet également la détection de quelques milliers de cellules de lactobacilles en 24 h au lieu de 5 à 7 jours par les méthodes classiques. Il est vrai que le seuil de détection des lactobacilles est beaucoup moins satisfaisant que celui des levures ce qui n'est pas surprenant puisque les performances de notre technique sont comme celles des techniques classiques, liées au taux de croissance. L'étude effectuée sur les lactobacilles a permis de poser les bases d'une généralisation de notre technique à la détection de divers micro-organismes : utilisation d'un milieu classique complété en ^{14}C - lysine après élimination chromatographique de la lysine froide.

Une autre caractéristique de notre méthode est sa vocation de test rapide devant permettre une décision immédiate sur le sort d'un lot de bière conditionnée ou en cours de fabrication. Alors que les analyses classiques fournissent des indications à posteriori destinées aux archives des laboratoires de contrôle, notre méthode radiométrique doit permettre d'intervenir en cours de fabrication.

La valeur quantitative de cette méthode prête à discussion dans la mesure où l'analyse ne renseigne pas sur la nature des germes de contamination et où elle met en jeu l'activité physiologique des cellules. L'intensité du signal radioactif caractérisera donc le produit analysé par un nombre traduisant son état de contamination global et tenant compte du nombre de contaminants présents, de leur nature et de leur activité.

La mise en oeuvre de cette technique ne pose pas de problème particulier de manipulation : elle ne nécessite pas beaucoup plus de temps de travail qu'une analyse classique mais elle doit être menée avec un soin rigoureux par un technicien expérimenté : signalons à ce propos que si dans l'application des méthodes d'analyse classiques, les contaminations accidentelles inhérentes à la manipulation sont souvent faciles à distinguer des contaminations réelles provenant du produit analysé, tel n'est pas le cas lorsqu'il s'agit d'appliquer notre méthode radiométrique : les moisissures en particulier, absorbent la lysine marquée au même titre que les levures. Il semble d'ailleurs paradoxal que la mise en oeuvre d'une méthode si rapide et sophistiquée de détection soit si semblable à celle des analyses classiques. Nous pensons que la prochaine étape à franchir avant que l'application de notre méthode puisse se généraliser dans l'industrie est son automatisation qui irait dans le sens de l'évolution se dessinant actuellement en faveur des méthodes rapides d'analyse dans les branches les plus évoluées de l'industrie alimentaire.

ooo 0 ooo

PROTOCOLE DE MISE EN OEUVRE DE L'ANALYSE
-----I - Préparation des milieux de culture1) - Milieu Y C B adapté à la recherche des levures

Le milieu utilisé pour la recherche des levures est le Yeast Carbon Base (Difco) complété par du sulfate d'ammonium 1 mM.

Préparation de 100 ml de milieu

- Dissoudre 2,36 g YCB dans de l'eau contenue dans un bēcher
- Ajouter 1 ml de solution de sulfate d'ammonium 0,1 M (solution préparée en dissolvant 1,32 g $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ dans 100 ml d'eau)
- Compléter à 98 ml d'eau
- Stériliser par filtration
- Transvaser aseptiquement le milieu dans un flacon stérile
- Ajouter aseptiquement 2 ml de solution de ^{14}C - lysine à $10 \mu\text{Ci/ml}$
- Conserver le milieu au congélateur

2) Milieu VLB - L41 adapté à la recherche des bactéries lactiques

Le milieu utilisé pour la recherche des bactéries lactiques est le VLB - L41 modifié par :

- Suppression de la lysine par chromatographie sur colonne
- Restitution d'arginine et d'histidine
- Ajustement à pH 6

Préparation de 100 ml de milieu

- Soumettre 100 ml de bière 10° Plato à ébullition jusqu'à réduction de de son volume à 50 ml
- Ajouter 1 g d'extrait de foie avant refroidissement
- Mélanger vigoureusement et laisser infuser pendant 1 h
- Filtrer le mélange

- Dissoudre dans le filtrat :
 - 1 g d'extrait de levure
 - 1 g d'hydrolysate de caséine (Difco)
- Faire subir à la solution azotée ainsi obtenue trois passages sur colonne d'Amberlite IRC - 50
 - . Dimensions de la colonne : hauteur 30 cm
diamètre 25 mm
 - . Tampon : acide acétique/acétate 0,1 M à pH5
 - . Vitesse d'élution : environ 20 gouttes par minute

Pour régénérer la colonne après chaque usage, faire circuler à travers la colonne une solution d'HCl N jusqu'à obtention complète de la forme H^+ de la résine (vérification au papier pH).

. récupérer 100 ml d'éluat

- Dissoudre dans l'éluat :

Maltose	0,5 g
Xylose	0,25 g
Fructose	0,25 g
Arginine	1 mg
Histidine	1 mg
Actidione	2 mg

Ajouter 0,4 ml d'alcool B-phényléthylrique

- Ajuster le milieu à pH 6 à la soude 5 N
- Stériliser le milieu par filtration
- Transvaser aseptiquement le milieu dans un flacon stérile
- Ajouter aseptiquement 2 ml de solution de ^{14}C - lysine à $10 \mu C_i/ml$
- Conserver le milieu au congélateur

II - Filtration et mise en culture des cellules

- Avant la filtration, introduire aseptiquement un tampon absorbant, diamètre 37 mm (Millipore 100 HP 1003700) dans une boîte de Pétri en position centrale.
- Imbiber le tampon de 1 ml de milieu à l'aide d'une pipette automatique. Les tampons ainsi imbibés se dessèchent rapidement ; il est donc conseillé d'effectuer cette opération peu de temps avant l'application de la membrane.

- Filtrer directement l'échantillon sur filtre à pores calibrés de 0,8 et à bords hydrophobes (Millipore 100 AAEP0 470 W)

On utilisera un appareil de filtration en acier inox préalablement stérilisé à l'eau bouillante.

- Saisir la membrane par son bord hydrophobe à l'aide d'une pince et l'appliquer aseptiquement sur le tampon imbibé de milieu en ayant soin :

- . de bien centrer la membrane sur le tampon de manière que le bord hydrophobe déborde autour du tampon

- . d'éviter tout contact entre la pince et le tampon imbibé de milieu radioactif

- Isoler les cultures ainsi préparées :

- . soit en fermant les boîtes de Pétri au ruban adhésif

- . soit en les introduisant dans une enceinte close.

- Mettre les cultures en incubation pendant le temps requis dans une étuve à 28° C pour la recherche des levures ou à 30° C pour la recherche des bactéries lactiques.

III - Rinçage et séchage des membranes

Les opérations suivantes ne nécessitent pas de conditions aseptiques de travail

- Oter la membrane en la saisissant par son bord hydrophobe et la placer sur un appareil de filtration. N'importe quel dispositif de filtration peut convenir à la condition impérative que la surface de rinçage couvre toute la surface centrale non hydrophobe de la membrane.

- Introduire le vide et rincer la périphérie hydrophobe de la membrane à l'aide d'une pissette d'eau.

- Sertir la membrane avec l'entonnoir de l'appareil de filtration et rincer avec 200 ml de solution de rinçage de composition suivante :

- . D-L lysine : 200 mg

- . DDN - 150 : 20 ml

- . Eau : q.s.p. 1 l

On obtiendra un meilleur rinçage en répartissant le volume de rinçage en trois ou quatre fractions, chaque fraction étant introduite après passage complet de la fraction précédente à travers la membrane.

- Après rinçage, déposer la membrane pendant quelques minutes sur une feuille de papier filtre, afin de la sécher grossièrement.

- Introduire la membrane dans un flacon pour mesure de scintillateur

- Laisser séjourner le flacon ouvert dans une étuve à 100° C pendant un quart d'heure, afin de compléter le séchage de la membrane.

IV - Comptage

Introduire dans le flacon 20 ml de liquide scintillant de composition suivante :

. P.P.O. (diphényl 2,5 - Oxazole)	5 g
. P.O.P.O.P. (P. Phénylènebis/phényl - 5 - oxazole)-2-2'	100 mg
. Toluène	q. s. p. 1 l

Après avoir bouché le flacon, compter l'activité de l'échantillon au spectromètre à scintillation liquide.

BIBLIOGRAPHIE

=====

- AMES, G. F. Arch. Bioch. Biophys. 104 (1964) 1
- AMES, G.F. et LEVER J. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 66 (1970) 1096
- BACHRACH et BACHRACH Appl. Microbiol. 28 (1974) 169
- BENKO, WOOD et SEGEL Arch. Bioch. Biophys. 122 (1967) 783
- BERGER, E.A., WEINER, J.H. et HEPPEL, L.A. Fed. Proc. 30 (1971) 1061
- BOURGEOIS C. Bull. Soc. chim. Biol. 51 (1969) 935
- BOURGEOIS C. et THOUVENOT D. Europ. J. Biochem. 15 (15 (1970) 140
- BOURGEOIS C. Thèse de Doctorat d'Etat, Paris, Septembre 1972
- BOURGEOIS C. Bios (1973) 134
- BOURGEOIS C., MAFART P. et THOUVENOT D. (1973) Proc. J. Eur. Brew. Convention (Salzbourg)
- BROWN K.D. J. Bacteriol 104 (1970) 77
- COHEN G.N. et MONOD J. J. Bacteriol Rev. 21 (1957) 169
- DE LAND F.H. et WAGNER H.W. J. Radiology 92 (1969) 154
- EVANCHO G. M. et ASHTON D.H. J. of Food Science 39 (1974) 77
- FARREL J. et al. J. Sci. Fd Agric. 18 (1967) 138
- FURLONG C.E. et WEINER J.H. Biochem. Biophys. Res. Commun 38 (1970) 1070
- GALE E.F. Symp. Soc. Exp. Biol. 8 (1954) 242
- GRENSON M. et al. B. B. A. 127 (1966) 325
- GRENSON M. HOU C. et CRABEEL M. J. Bacteriol 103 (1970) 770
- GRENSON M. et HOU C. Biochem. Biophys. Res. Commun. 4 (1972) 749
- GUARDOLA J. et al. J. of Bacteriol. 117 (1974) 393
- HALVORSON H. O. et COHEN G.N. Ann. Inst. Pasteur 95 (1958) 73
- HAMILTON W.A. J. Gen. Microbiol. 50 (1968) 441
- HARRISON J., WEBB T.J.B. et MARTIN P.A. Inst. of Brew. 80 (1974) 390
- HEIM, CUCTIN et LEVIN Antimicrobiol. Agents (1960)
- JOHNSTON W.H. Laboratories, Inc, Brevet déposé aux Etats-Unis le 25 octobre 1968, n° 770 484 sous le nom de JOHN R. WATERS
- KILBOURN et BRAMHALL V.A. Abstract of the Annual Meeting of the American Society for Microbiol. (1973)
- KOGA Y., AIBARA K. et TSUGO T. XVIIIe Congr. Int. Lait 17 (1970) 153
- LAMPI R.H. et al. Food Technology (1974) 52
- LEVIN G.V. et al. J. Am. Water Works Assoc. 48 (1956) 77
- LEVIN G.V., HARRISSON V.R., HESS W.C. J. Am. Water Works Assoc. 49 (1957) 1069
- LEVIN G.V. Advan. Appl. Microbiol. 5 (1963) 93

- MAC LEOLD R.A. et al. Appl. Microbiol. 14 (1966) 979
- MILLER D.L. et RODWELL V.W. J. Biochem. 246 (1971) 1765
- MITCHELL P. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 20 (1970) 121
- NAIR J.H. Anal Chem. 25 (1953) 1912
- NASA Techn. Brief. 71 - 10051 ; 71 - 10055
- NIELSON E. S. Conseil Permanen Intern. Exploration Mer 18 (1963) 117
- NIVEN D. F., JEACOCKE R.E et HAMILTON W.A., FEBS Letters 29 (1973) 248
- OXENDER Biomembranes 5 (1974) 25
- PALL M. L. B. B. A. 173 (1969) 113
- PENROSE W. R. et al. J. Biol. Chem. 243 (1968) 5921
- PREVITE J. J. Appl. Microbiol. 24 (1972) 535
- RANDALL E. L. Abstr. of the Annual Meeting of the Am. Soc. for Microbiol. 1972 (87)
- RANDALL E. L. Abstr. of the Annual Meeting of the Am. Soc. for Microbiol. 1973 (72)
- RICHARDS M. Wallerstein Lab. Commun, n° 33, 110 (1970) 11
- RICKENBERG H. V. et al. Ann. Inst. Pasteur 91 (1956) 829
- RONKES S.C.E. et LEWIS M.J. Appl. microbiol. 21 (1971) 799
- ROSEN B.P. et VASINGTON F.D. Fed. Proc. 29 (1970) 342
- ROSEN B.P. et VASINGTON F.D. J. Biol. Chem. 246 (1971) 5351
- ROSEN B.P. J. Biol. Chem. 246 (1971) 3653
- ROSEN B.P. J. Biol. Chem. 248 (1973) 1211
- ROSNER R. Appl. Microbiol. 28 (1974) 644
- SHARF J. M. American Public Health Assoc, Inc, New-York (1966)
- SKULACHEN V.P. Adstr. Commun. Mett. Fed. Eur. Biochem. Soc. 8 (1972)
- SURDIN Y. et al. C. R. Acad. Sci. Paris 258 (1964) 5046
- SURDIN Y. et al. Biochem. Biophys. Acta 107 (1965) 546
- SVIHLA G., SCHENK F. et DAINKO J. Bacteriol. Proc. (1963)
- WASHINGTON J.A. et YU P.K.W. Appl. Microbiol. 22 (1972) 100
- WATERS J. R. Appl. Microbiol. 23 (1972) 198
- WICKERHAM L. J. US Dépt. Agric. Techn. Bull (1951) 1029
- YEE et al. Private Communication, US Army Biol. Lab. (1958)'

